

(51) 国際特許分類6 C07K 14/715, 16/28, C12N 15/12, C12P 21/02, C12Q 1/68, C12N 5/20, C12P 21/08, G01N 33/577, 33/53, A61K 45/00, 39/395, 38/17	A1	(11) 国際公開番号 WO98/46644
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01728		(43) 国際公開日 1998年10月22日(22.10.98)
(22) 国際出願日 1998年4月15日(15.04.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/97808 特願平9/151434 特願平9/217897 特願平9/224803 特願平9/332241	JP JP JP JP JP	津田英資(TSUDA, Eisuke)[JP/JP] 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町祇園2-13-1 ダイアパレス自治医大5番館407 Tochigi, (JP) 後藤雅昭(GOTO, Masaaki)[JP/JP] 〒329-0502 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1 Tochigi, (JP) 矢野和樹(YANO, Kazuki)[JP/JP]
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP)		〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1 Tochigi, (JP) 友保昌拓(TOMOYASU, Akihiro)[JP/JP] 〒329-0519 栃木県下都賀郡石橋町大松山1-3-3E SKマンション Tochigi, (JP) 小林文枝(KOBAYASHI, Fumie)[JP/JP] 〒329-1104 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4 Tochigi, (JP) 鷲田尚洋(WASHIDA, Naohiro)[JP/JP]
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 山口京二(YAMAGUCHI, Kyoji)[JP/JP] 〒330-0006 埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガーデン東大宮1-524 Saitama, (JP) 保田尚孝(YASUDA, Hisataka)[JP/JP] 〒329-0433 栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46 Tochigi, (JP) 中川信明(NAKAGAWA, Nobuaki)[JP/JP] 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ2-4 Tochigi, (JP)		高橋 研(TAKAHASHI, Ken)[JP/JP] 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ1-4 Tochigi, (JP) 森永伴法(MORINAGA, Tomonori)[JP/JP] 〒321-0203 栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12 Tochigi, (JP) 東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)[JP/JP] 〒350-0822 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP)
島 伸行(SHIMA, Nobuyuki)[JP/JP] 〒329-0433 栃木県河内郡南河内町緑4-17-28 Tochigi, (JP) 木野崎雅彦(KINOSAKI, Masahiko)[JP/JP] 〒329-0528 栃木県河内郡上三川町ゆうきが丘53-8 Tochigi, (JP)		(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)
		(81) 指定国 AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称 新規蛋白質及びその製造方法

(57) Abstract

A novel protein binding to osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) (OCIF-binding molecule; OBM). A DNA encoding the above protein; a protein having the amino acid sequence encoded by this DNA; a process for producing this protein by the genetic engineering technique; and medicinal compositions containing this protein. A method for screening a substance regulating the expression of the above protein, a substance inhibiting or modifying the biological activity of the above protein, or a receptor binding to the above protein and thus mediating its function with the use of the above protein and the DNA thereof; substances thus obtained; and medicinal compositions containing the substances thus obtained. An antibody against the above protein; a method for assaying the above protein by using the antibody; and drugs containing the antibody.

破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor ; OCIF) に結合する新規な蛋白質 (OCIF結合分子 ; OBM)、及びその製造方法。

該蛋白質をコードする DNA、この DNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、該蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する医薬組成物。

該蛋白質びその DNAを用いた、該蛋白質の発現を調節する物質、該蛋白質の生物活性を阻害又は修飾する物質、あるいは該蛋白質と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これにより得られた物質、及び得られた物質を含有する医薬組成物。

該蛋白質に対する抗体、その製造方法、それを用いた該蛋白質の測定方法、及び抗体を含有する医薬。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英國	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チヤード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルガリア・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	共和国	共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
CG	コンゴー	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴースラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スードン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	L!	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

新規蛋白質及びその製造方法

技術分野

本発明は、破骨細胞形成抑制因子（osteoclastogenesis inhibitory factor；以下、OCIFといふことがある）に結合する新規な蛋白質（OCIF結合分子；以下OBMといふことがある）、及びその製造方法に関する。

また本発明は、該蛋白質をコードするDNA、このDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、該蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する医薬組成物に関する。

さらに本発明は、該蛋白質びそのDNAを用いた、該蛋白質の発現を調節する物質、該蛋白質の生物活性を阻害又は修飾する物質、あるいは該蛋白質と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これにより得られた物質、及び得られた物質を含有する医薬組成物に関する。

またさらに本発明は、該蛋白質に対する抗体、その製造方法、それを用いた該蛋白質の測定方法、及び抗体を含有する医薬に関する。

背景技術

骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の、総合された活性に依存している。骨代謝異常は、骨形成と骨吸収の均衡が崩れることにより発生すると考えられている。骨代謝の異常を伴う疾患としては、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、腎性骨異栄養症、慢性関節リューマチ、及び変形性関節炎などが知られている。これらの骨代謝異常疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上まわることにより発生する疾患であり、骨の石灰質と骨基質とが等しく減

少することを特徴とする。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、骨の疼痛が発生し、骨の脆弱化による骨折が起こる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の原因となり、この疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は、骨形成の促進、骨吸収の抑制、あるいはこれらのバランスの改善により治療できることが期待される。即ち、骨形成は、骨形成を担当する骨芽細胞の増殖、分化、機能を促進すること、破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟を抑制すること、あるいは破骨細胞の骨吸収活性などの機能を抑制することにより促進されると期待される。このような活性を有するホルモン、低分子物質、あるいは生理活性蛋白質について、現在精力的な探索及び開発研究が進められている。

すでに、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、カルシトニン製剤、活性型ビタミンD₃製剤、エストラジオールを含有するホルモン製剤、イプリフラボン、ビタミンK₂、ビスフォスフォネート系化合物などがあり、さらに、より副作用が少なく、有効性に優れた治療薬の開発を目指して活性型ビタミンD₃誘導体、エストラジオール誘導体、第2世代または第3世代のビスフォスフォネート系化合物などの臨床試験が実施されている。

しかし、これらの薬剤を用いた治療法は、その効果並びに治療結果において必ずしも満足出来るものではなく、より安全かつ有効性の高い新しい治療薬の開発が期待されている。また、骨代謝疾患の治療に使用されている薬剤の中には、その副作用により治療可能な疾患が限定されているものもある。更に現在、骨粗鬆症などの骨代謝疾患の治療には、複数の薬剤を同時に使用する多剤併用療法が主流になってきている。このような観点から、従来の医薬品とは異なった作用メカニズムを持ち、しかもより有効性が高くかつ副作用の少ない医薬品の開発が期待

されている。

前述したように、骨代謝を担当する細胞は骨芽細胞と破骨細胞である。これらの細胞は互いに密接に相互作用していることが知られており、この現象はカップリングと呼ばれている。即ち、破骨細胞の分化、成熟には骨芽細胞様ストローマ細胞が分泌するサイトカイン類、インターロイキン1 (IL-1)、3 (IL-3)、6 (IL-6)、11 (IL-11)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、インターフェロンガンマー (IFN- γ)、腫瘍壞死因子 α (TNF- α)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) などが促進的又は抑制的に作用することが報告されている (Raisz: Disorders of Bone and Mineral Metabolism, 287-311, 1992; Suda et al.: Principles of Bone Biology, 87-102, 1996; Suda et al.: Endocrine Reviews, 4, 266-270, 1995, Lacey et al.: Endocrinology, 186, 2369-2376, 1995)。骨芽細胞様ストローマ細胞は、未熟な破骨細胞前駆細胞や破骨細胞との細胞間接着により、それぞれ破骨細胞の分化、成熟や成熟破骨細胞による骨吸収などの機能発現に重要な役割を演じていることが知られている。この細胞間接着による破骨細胞形成に関与する因子として、骨芽細胞様ストローマ細胞の膜上に発現される破骨細胞分化誘導因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) (Suda et al.: Endocrine Rev. 13, 66-80, 1992; Suda et al.: Bone 17, 87S-91S, 1995) という分子が仮想されており、この仮説によれば破骨細胞の前駆細胞に ODF のレセプターが存在している。しかし、ODF 及びこのレセプターとも未だ精製及び同定されておらず、それらの性質、作用機作、及び構造に関する報告もない。このように、破骨細胞の分化、成熟のメカニズムは未だ十分に解明されておらず、このメカニズムの解明は基礎医学領域に多大な貢献をするだけでなく、新しい作用メカニズムに基づく新規な骨代謝異常症治療薬の開発にも貢献することが期待される。

本発明者らは、このような状況に鑑み銳意探索を進めた結果、ヒト胎児肺線維芽細胞、IMR-90 (ATCC CCL186)の培養液中に破骨細胞形成抑制因子(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)を見出した(WO96/26217号)。

さらに、本発明者らは、OCIFのDNAクローニング、動物細胞を用いた遺伝子組み換え型OCIFの生産、遺伝子組み換え型OCIFによるin vivo薬効（骨代謝改善効果）の確認などに成功した。OCIFは、従来の医薬品よりも有効性が高くかつ副作用が少ない、骨代謝異常に関連する疾患の予防及び治療剤として期待されている。

発明の開示

本発明者らは破骨細胞形成抑制因子OCIFを用い、その結合蛋白質の存在を銳意探索した結果、OCIF結合蛋白質が活性型ビタミンD₃や副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)などの骨吸収促進因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞上に特異的に発現することを見出した。さらに、このOCIF結合蛋白質の性質及びその生理的機能を調べたところ、該蛋白質は未熟な破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟に関与する、いわゆる破骨細胞分化、成熟を支持又は促進する因子としての生物活性を有していることを見出し、本発明を成すに至った。さらに、本発明蛋白質につき研究を重ねた結果、この新規な膜蛋白質は骨芽細胞様ストローマ細胞と脾臓細胞との共培養系において、骨芽細胞様ストローマ細胞による未熟な破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟を担う重要な蛋白質であることを明らかにした。本発明における破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する因子としての蛋白質の同定及びその単離精製の成功により、本発明蛋白質を利用した、生体の骨代謝機構に基づいた新規な骨代謝異常症治療薬のスクリーニングを可能にした。

従って本発明は、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規な蛋白質(OCIF結合分子; OBM)、及びその製造方法を提供することを課題とする。また本発明は、

該蛋白質をコードする DNA、この DNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、該蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する医薬組成物を提供することを課題とする。また、該蛋白質を含有する骨代謝異常症予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。さらに本発明は、該蛋白質を及びその DNAを用いた、該蛋白質の発現を調節する物質、該蛋白質の生物活性を阻害又は修飾する物質、あるいは該蛋白質と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これにより得られた物質、及び得られた物質を含有する医薬組成物を提供することを課題とする。またさらに本発明は、該蛋白質に対する抗体、その製造方法、それを用いた該蛋白質の測定方法、及び抗体を含有する医薬を提供することを課題とする。

本発明蛋白質は、以下の物理化学的性質及び生物活性を示す。

即ち、

- a. 親和性：破骨細胞形成抑制因子（osteoclastogenesis inhibitory factor；OCIF）に特異的に結合し、高い親和性（細胞膜上での解離定数、Kd値が 10^{-9} M以下）を有する。
- b. 分子量：非還元条件下におけるSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分子量測定で、約30,000-40,000 の分子量を示し、又、モノマータイプのOCIFとクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は、約90,000-110,000を示す。
- c. 生物活性：活性型ビタミンD₃及び副甲状腺ホルモン（PTH）などの、骨吸収促進因子の存在下でのマウス骨芽細胞様ストローマ細胞とマウス脾臓細胞共培養において、破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する活性を有する。

破骨細胞形成の代表的なインビトロ培養系として、活性型ビタミンD₃あるいはPTH存在下でのマウス由来骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 とマウス脾臓細胞との共培養系がよく知られている。本発明蛋白質の発現細胞は活性型ビタミンD₃

存在あるいは非存在下でそれぞれ培養したマウス骨芽細胞様ストローマ細胞あるいはマウス脾臓細胞へのOCIFの結合性を試験することにより調べることができる。本発明蛋白質は、活性型ビタミンD₃やPTHのような骨吸収促進因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞上に特異的に誘導される蛋白質として特定される。又、活性型ビタミンD₃存在下の上記共培養系にOCIFを添加することにより1から40 ng/mlの範囲で用量依存的に破骨細胞の形成が阻害されること、活性型ビタミンD₃存在下でST2 細胞上に誘導される本発明蛋白質の発現の経時変化と破骨細胞形成の経時変化とがよく相関すること、又、ST2 細胞に発現される本発明蛋白質の多寡とST2 細胞による破骨細胞形成支持能の強弱が一致し、ST2 細胞上の本発明蛋白質にOCIFが結合することにより破骨細胞形成が完全に抑制されることから、本発明蛋白質は破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する生物活性（作用）を有する蛋白質として特定される。

本発明蛋白質のOCIFに対する親和性は、OCIFを標識し、その標識体の動物細胞膜表面への結合性を試験することによって評価することができる。OCIFは、放射性同位元素による標識や蛍光標識などの通常の蛋白質標識法を用いることによって標識することができる。例えば、OCIFの放射性同位元素による標識としてはチロシン残基の¹²⁵I標識が挙げられ、ヨードジェン法、クロラミンT法、及び酵素法などの標識法を利用することができる。このようにして得た標識OCIFを用いた、OCIFの動物細胞膜表面への結合性試験は常法に従い実施でき、又、結合性試験に用いる培地に標識OCIFの100倍から400倍濃度未標識OCIFを添加することにより、非特異的な結合量を測定することができる。OCIFの特異的結合量は、標識OCIFの総結合量から非特異的な結合量を差し引くことにより算出される。細胞膜上に発現された本発明蛋白質の親和性は標識OCIFの添加量を変えて試験を行い、特異的結合量をScatchard plotで解析することによって評価される。この

ようにして求められた、本発明蛋白質のOCIFに対する親和力は約 100-500pMであり、本発明蛋白質はこのように破骨細胞形成抑制因子OCIFに高い親和性（細胞膜上の解離定数、Kd値が 10^{-9} M以下）を有する蛋白質として特定される。OBM の分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーやSDS-PAGE等を用いて測定される。より正確に分子量を測定するためには、SDS-PAGEを用いるのが好ましく、OBM は、還元条件下で約 40,000(40,000±4,000)の分子量を有する蛋白質として特定される。

本発明蛋白質は、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株 ST2、マウス前脂肪細胞株 PA6、その他のヒト骨芽細胞様細胞株、あるいはヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物から採取し濃縮した骨芽細胞様細胞などから得ることができる。又、これらの細胞に本発明蛋白質を発現させるために必要な誘導物質としては、活性型ビタミンD₃ (Calcitriol)、副甲状腺ホルモン (PTH)、インターロイキン(IL)-1、IL-6、IL-11、オンコスタチンM及び白血病細胞増殖抑制因子LIF)などの骨吸収促進因子が挙げられる。又、これらの誘導物質の添加濃度としては、活性型ビタミンD₃やPTH では、 10^{-8} M、IL-11 やオンコスタチンMではそれぞれ 10ng/ml及び1ng/ml、IL-6では 20ng/mlのIL-6と500ng/mlのIL-6可溶性レセプターを用いるのが望ましい。好ましくは、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2 を用い、 10^{-8} M活性型ビタミンD₃、 10^{-7} Mデキサメサゾン、及び10%牛胎児血清を添加したα-MEM 中で一週間以上培養してコンフルエントにした細胞を用いるとよい。このようにして培養した細胞はセルスクレイパーなどを用いて剥離させ、回収するとよい。又、回収した細胞は使用するまでの間-80°Cで保存しておくことができる。

本発明蛋白質は、このようにして回収した細胞の膜画分から精製すると効率良く精製することができる。膜画分の調製は、細胞内器官の分画に利用される通常の方法に従って行うことができる。膜画分の調製に使用する緩衝液には、好ましくは各種プロテアーゼ阻害剤を添加するとよい。添加するプロテアーゼ阻害剤と

しては、例えばPMSF、APMSF、EDTA、O-フェナントロリン、ロイペプチノ、ペプスタチンA、アプロチニン、大豆トリプシンインヒビターなどのセリンプロテアーゼ阻害剤、チオールプロテアーゼ阻害剤、及びメタロプロテアーゼ阻害剤などが挙げられる。細胞の破碎には、Daunceホモジナイザー、ポリトロンホモジナイザー、超音波破碎装置などを用いることが出来る。破碎した細胞は 0.5 M シュクロースを加えた緩衝液に懸濁させ、 $600 \times g$ で10分間遠心分離することにより、細胞核と未破碎の細胞を沈殿画分として分離することができる。遠心分離で得た上清を $150,000 \times g$ で90分間遠心分離することにより、沈殿画分として膜画分を得ることができる。このようにして得た膜画分を各種の界面活性剤で処理することにより、細胞膜に存在する本発明蛋白質を効率良く可溶化し、抽出することができる。可溶化に用いる界面活性剤としては、細胞膜蛋白質の可溶化に一般的に使用されている各種界面活性剤、例えばCHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、Triton X-100、Nikkol、n-オクチルグリコシドなどを用いることができる。好ましくは、0.5 % CHAPSを添加して4°Cで2時間攪拌し、本発明蛋白質を可溶化するのが良い。このようにして調製したサンプルを、 $150,000 \times g$ で60分間遠心分離し、その上清を可溶化膜画分として得ることができる。

このようにして得られた可溶化膜画分からの本発明蛋白質の精製は、OCIFを固定化したカラム、ゲル、樹脂などを用いて効率よく精製することができる。固定化に使用するOCIFとしては、W096/26217号公報記載の方法に従って、ヒト胎児肺線維芽細胞株IMR-90の培養液から単離したもの、あるいは遺伝子工学的手法により得られたもの(rOCIF)を使用することができる。これらの rOCIFは、ヒト、ラット、あるいはマウスのcDNAを常法に従って発現ベクターに組み込み、CHO 細胞、BHK 細胞、Namalwa 細胞などの動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製

することによって得ることができる。このようにして得られたOCIFは、分子量約60kDa(モノマー型)と120kDa(ダイマー型)の分子量を示すが、固定化に用いるOCIFとしては、好ましくはダイマー型OCIFを用いる。OCIFを固定化するためのゲル、樹脂としてはECH セファロース4B、EAH セファロース4B、チオプロピルセファロース6B、CNBr-活性化セファロース4B、活性化CHセファロース4B、エポキシ活性化セファロース6B、活性化チオールセファロース4B(以上、ファルマシア社)、TSKgel AF-エポキシトヨパール650、TSKgel AF-アミノトヨパール650、TSKgel AF-フォルミルトヨパール650、TSKgel AF-カルボキシトヨパール650、TSKgel AF-トレシルトヨパール650(以上、トーソー社)、アミノーセルロファイン、カルボキシーセルロファイン、FMP 活性化セルロファイン、フォルミルーセルロファイン(以上、生化学工業社)、アフィゲル10、アフィゲル15、アフィプレップ10(以上、BioRad社)などを用いることができる。又、OCIFを固定化するためのカラムとしては HiTrap NHS-activated カラム(ファルマシア社)、TSKgel Tresyl-5PW(トーソー社)などを用いることができる。HiTrap NHS-activated カラム(1 ml、ファルマシア社)を用いたOCIFの固定化法として、具体的には以下の方法を挙げることができる。即ち、OCIF 13.0 mgを含む 0.2 M NaHCO₃/0.5 M NaCl(pH 8.3)溶液1 mlをカラムに添加し、室温で30分間カップリング反応させる。次いで、0.5 M エタノールアミン/0.5 M NaCl(pH 8.3)と0.1 M 酢酸/0.5 M NaCl(pH 4.0)を流し、再度0.5 M エタノールアミン/0.5 M NaCl(pH 8.3)に置き換え、室温で1 時間放置し、過剰な活性基を不活性化する。その後、0.5 M エタノールアミン/0.5 M NaCl(pH 8.3)と0.1 M 酢酸/0.5 M NaCl(pH 4.0)で 2度洗浄し、50 mM Tris/1 M NaCl/0.1% CHAPS 緩衝液(pH 7.5)で置換することにより、OCIF固定化カラムを作製することができる。このようにして作製したOCIF固定化カラムやOCIF固定化ゲルあるいは樹脂などを用い、本発明蛋白質を効率よく

精製することができる。本発明蛋白質の分解を抑制するために、精製に用いる緩衝液にも上記の各種プロテアーゼ阻害剤を添加するとよい。本発明蛋白質は、上記の可溶化膜画分をOCIF固定化カラムに負荷する、あるいはOCIF固定化ゲル、樹脂などと混ぜて攪拌することによって吸着させ、酸、各種蛋白質変性剤、カコジレートバッファーなどによってOCIF固定化カラム、ゲル、あるいは樹脂などから溶出することができる。好ましくは、本発明蛋白質の変性を最小限に抑えるため、酸を用いて溶出し直ちに中和するとよい。溶出に用いる酸性緩衝液としては、例えば0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0)、0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.0)、及び0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0)などを用いることができる。

このようにして精製した本発明蛋白質は、生物試料からの蛋白質の精製に汎用される通常の方法を用いて、本発明蛋白質の物理化学的性質を利用した各種の精製操作により更に精製することができる。本発明蛋白質溶液の濃縮には限外濾過、凍結乾燥及び塩析など、通常、蛋白質の精製過程で用いられる手法が挙げられる。好ましくは、Centricon-10 (BioRad社)などを用いた遠心による限外濾過を用いるのが良い。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動などを用いた通常の蛋白質の精製に利用される各種の手法を組み合わせて用いることができる。より具体的には、Superose 12 カラム (ファルマシア社)などを用いたゲル濾過クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーを組み合わせて用いることにより、本発明蛋白質を純化することが可能である。又、精製過程中の本発明蛋白質の同定は、固定化OCIFとの結合活性あるいはOCIFとの結合物を抗OCIF抗体による免疫沈降後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で分析することにより検出できる。

このようにして得られた本発明蛋白質は、その活性より骨代謝異常症、例えば大理石病などの治療剤としての医薬、あるいは研究・診断用試薬として有用である。

また本発明は、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規な蛋白質（OCIF結合分子；OBM）をコードするDNA、そのDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、それを用いてOCIFに特異的に結合する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝治療剤に関する。さらに本発明は、OBMの発現を調節する物質のスクリーニング方法、OBMと結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、OBMと結合しOBMの作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これらのスクリーニングの結果得られた物質を含むする医薬組成物に関する。

本発明のDNAによりコードされる新規蛋白質OBMは、以下の物理化学的性質及び生物活性を示す。

即ち、

- a. 破骨細胞形成抑制因子（OCIF）に特異的に結合する。
- b. 還元条件下におけるSDS-PAGEによる分子量測定で、約40,000（±4,000）の分子量を示す。又、モノマータイプのOCIFとクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は約90,000-110,000である。
- c. 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する。

ものである。

本発明のOCIF結合分子、OBMをコードするDNAを同定し、OBMの性質を評価するためのプローブとして使用するヒト破骨細胞形成抑制因子（OCIF）は、W096/26217号に従ってヒト胎児性線維芽細胞株IMR-90の培養液から単離することができる。OBMのDNAの単離、同定には、遺伝子組換え型ヒトOCIF、遺伝子組換え型マ

ウスOCIF、遺伝子組換え型ラットOCIF等を用いることもできる。これらの遺伝子組換え型OCIFはそれぞれのDNAを常法に従って発現ベクターに組み込み、CHO細胞、BHK細胞、Namalwa細胞等の動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製することによって得ることができる。

目的の蛋白質をコードするcDNAを分離する(cDNAクローニング)方法としては、その蛋白質の部分アミノ酸配列を決定しそれに対応する塩基配列をもとにハイブリダイゼーション法により目的のcDNAを単離する方法の他に、蛋白質のアミノ酸配列が不明であっても発現ベクター中にcDNAライブラリーを構築し、それらを細胞中に導入し、目的の蛋白質の発現の有無をスクリーニングすることにより、目的のcDNAを単離する方法(発現クローニング法)がある(D'Andrea et al.: Cell 57, 277-285, 1989; Fukunaga et al.: Cell 61, 341-350, 1990)。発現クローニング法では、宿主細胞として細菌、酵母、動物細胞などが目的に応じて使い分けられている。本発明のように動物細胞の膜表面に存在すると考えられる蛋白質をコードするcDNAをクローニングする際には、動物細胞を宿主とする場合が多い。又、DNAの導入効率が高く、導入されたDNAの発現効率の高い宿主が通常使用される。そのような特徴を持つ細胞のひとつが、本発明で用いたサル腎臓細胞COS-7細胞である。COS-7細胞ではSV40 large T antigenが発現しているため、SV40の複製開始点を持つプラスミドは細胞中で多コピーのエピソームとして存在するようになり、通常より高発現が期待できる。又、DNAを導入した時点から数日のうちに最高の発現レベルに到達するので迅速なスクリーニングに適している。この宿主細胞に高発現可能なプラスミドを組み合わせることによって、極めて高レベルの遺伝子発現が可能となる。プラスミド上で最も遺伝子の発現量に影響を与える因子はプロモーターであり、高発現用のプロモーターとしてSR α プロモーターやサイトメガロウィルス由来プロモーター等がよく使用される。

発現クローニングにより膜蛋白質の c DNAをクローニングしようとする際のスクリーニング法として、バインディング法 (binding 法) 、パニング法 (panning 法) 、フィルムエマルジョン法などが考案されている。

本発明は、発現クローニング法とバインディング法を組み合わせることによって得たOCIFに特異的に結合する蛋白質 (OBM) をコードする DNA及び発現蛋白質、及び DNA又は発現蛋白質を用いた生理活性物質のスクリーニングに関する。本発明の DNAがコードするOBM は、OCIFを標識し、その標識体の動物細胞膜表面への結合性を試験することによって検出することができる。OCIFの標識法としては、放射性同位元素による標識や蛍光標識等、一般的な蛋白質の標識法を用いることができる。例えば、OCIFの放射性同位元素による標識としてはチロシン残基の ¹²⁵I 標識が挙げられ、具体的標識法としてヨードジエン法、クロラミンT法及び酵素法等がある。OCIFの動物細胞膜表面への結合性はこのようにして得た標識OCIFを用い、常法に従った方法で試験できる。又、結合性の試験に用いる培地に標識OCIFの 100倍から 400倍濃度の未標識OCIFを添加することにより、非特異的な結合量を測定できる。OCIFの特異的結合量は、標識OCIFの総結合量から非特異的な結合量を差し引くことにより算出される。

本発明者らは、破骨細胞の分化に関与する因子はOCIFと相互作用するとの仮定のもと、遺伝子組み換え型OCIFを用い、OCIFが結合する蛋白質を分離するため、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2 のmRNAから作製した発現ライブラリーを以下に述べる方法でスクリーニングした。ST2 mRNAをもとに合成した DNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、それらをサル腎臓細胞 COS-7細胞に遺伝子導入した。¹²⁵I 標識したOCIFをプローブとして用いて COS-7細胞上に発現した目的の蛋白質をスクリーニングした。その結果、OCIFと特異的に結合する蛋白質をコードする DNAを分離するに至り、このOCIF結合分子 (OCIF結合分子 ; OBM) をコード

する DNAの塩基配列を決定した。又、この DNAにコードされるOBM は細胞膜上で OCIFと強くしかも特異的に結合することを見出した。

本発明でいう比較的温和な条件での DNAハイブリダイゼーションとは、例えば常法に従いナイロンメンブレンに DNAをトランスファーし固定化した後、ハイブリダイゼーション用バッファー中で放射線標識したプローブの DNAと40~70°C、2 時間~1 晩程度ハイブリダイゼーションさせ、0.5×SSC(0.075M 塩化ナトリウム及び0.0075M クエン酸ナトリウム) で45°C10分洗浄する条件を言う。具体的には、常法に従い、ナイロンメンブレンにハイボンドN (アマシャム社) を用い、DNAをトランスファーし固定化した後、Rapid Hybridization Buffer (アマシャム社) 中で³²P 標識したプローブの DNAと65°C 2 時間ハイブリダイゼーションさせて、0.5 × SSC (0.075M 塩化ナトリウム及び 0.0075M クエン酸ナトリウム) で45°C10分洗浄する条件を言う。

破骨細胞形成の代表的なインビトロ培養系として、活性型ビタミンD₃あるいはPTH の存在下でのマウス由来骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 とマウス脾臓細胞との共培養系がよく知られている。本発明のOBM は活性型ビタミンD₃やPTH のような骨吸収促進因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞上に特異的に誘導される蛋白質として特定される。更に、活性型ビタミンD₃あるいはPTH 非存在下でもマウス脾臓細胞の培養系に本発明の DNAによりコードされる蛋白質を添加することによって破骨細胞の形成が促進されることから、本発明の DNAによりコードされるOBM は破骨細胞の分化、成熟に関与していると考えられる。

本発明の DNAを発現ベクターに挿入してOBM 発現プラスミドを作製し、これを各種の細胞又は菌株に導入して発現させることにより、組み換え型OBM を製造することができる。発現させる際の哺乳動物細胞の宿主として COS-7、CHO 、Name lwa など、又は細菌の宿主として大腸菌などを、用いることができる。その際、

DNAの全長を用いて膜結合型蛋白質として発現させる、あるいは膜結合部位をコードする部分を除去することにより分泌型、可溶化型としても発現させることができる。このようにして製造された組み換え型OBMは、通常用いられる蛋白精製法、例えばOCIF固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、あるいはゲル濾過クロマトグラフィーなどを組み合わせることにより、効率よく精製することができる。このようにして得られた本発明蛋白質は、その活性より骨代謝異常症、例えば大理石病などの治療剤としての医薬、あるいは研究・診断用試薬として有用である。

本発明のDNAにコードされる蛋白質OBMを利用して、(1)OBMの発現を調節する物質のスクリーニング、(2)OBMに特異的に結合し、OBMの生物活性を阻害、あるいは修飾する物質のスクリーニング、及び(3)破骨細胞前駆細胞に存在し、OBMの生物活性を伝達する蛋白質(OBMレセプター)のスクリーニング、更にはこのOBMレセプターを利用したアンタゴニストやアゴニストの開発が可能である。上述のOBMあるいはOBMレセプターを用いたコンビナトリアルケミストリーにおいて、アンタゴニストあるいはアゴニストの探索に必要なペプチドライブラリーは具体的に以下の方法で作製することができる。その一つに、スプリット法がある(Lam et al. ; Nature 354, 82-84, 1991)。この方法は、合成担体(ビーズ)にそれぞれのアミノ酸(ユニット)を結合させたものを各ユニットごと別々に合成する。この合成された担体を一度すべて混ぜ、次にユニットの数に等分し、次のユニットをまた各々結合させる。この操作をn回繰り返すことにより、担体にn個のユニットが結合したライブラリーが作製される。このように合成を行うと一つの担体群には、1種類の配列しか合成されないので、本発明の蛋白質を用いた上記のスクリーニング法で陽性を示した担体群を選びだし、そのアミノ酸配列を決定すれば、特異的に結合するペプチドを同定することができる。又、別の方

法としてファージディスプレイ法を用いることもできる。この方法はランダムなペプチドをコードする合成遺伝子をファージで発現させるもので、上記合成ライブラリーに比べ、ライブラリー中の分子数を多くできるという利点があるものの、ファージが嫌う配列はライブラリーに存在し得ないことなどがあり、分子数当たりの多様性が低いという欠点がある。ファージディスプレイ法でも同様に、本発明の蛋白質を用いたスクリーニング系を利用し、それに特異的に結合するファージをパニングにより濃縮し、得られた特異的結合性を有するファージを大腸菌で増幅し、そのペプチドをコードする塩基配列を決定すればよい。更に、前記(2)及び(3)のスクリーニング系を使用し、ペプチドライブラリーからOCIFあるいはOBM レセプターに特異的かつ高親和性のペプチドをスクリーニングしたい場合、スクリーニング時にそれぞれOCIFやOBM を共存させ、それぞれの濃度を上げながら、陽性を示した担体あるいはファージをスクリーニングすることにより、特異的かつ極めて高親和性のペプチドを得ることができる。例をあげれば、すでに造血ホルモンであるエリスロポエチン (EPO)のレセプターを用い、多様性に富んだペプチドライブラリーからのEPO 様活性を有する低分子ペプチドアゴニストのスクリーニング及びその立体構造解析、更にはその立体構造に基づいた有機合成展開によるEPO 活性を有する低分子物質（アゴニスト）の創製に成功している (Nicholas et al.: Science, 273, 458-463, 1996)。

また本発明者らは、破骨細胞形成抑制因子OCIFを用い、その結合蛋白質が活性型ビタミンD₃や副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)などの骨吸収因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 の細胞上に特異的に発現することをすでに見出した。さらに、該蛋白質は未熟な破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟に関与する、いわゆる破骨細胞分化、成熟を支持又は促進する因子としての生物活性を有していることを見出し、該蛋白質を精製するこ

とによりその物理化学的諸性質及びその生物活性を明らかにした。本発明者らは、本発明の DNAにより発現される遺伝子組み換え型蛋白質OBM と、すでに前記OCIF と特異的に結合する精製天然型蛋白質との異同を明らかにすべく、物理化学的性質及び生物活性を比較した。その結果、両蛋白質とも①膜結合蛋白質であり、特異的にOCIFと結合し、②SDS-PAGEでの分子量は約40,000、③モノマータイプのOCIFとクロスリンキングさせた場合の見かけの分子量は約90,000 - 110,000であり、物理化学的諸性質がよく一致していること、又、生物活性においても、両蛋白質は破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する活性を有していることから、両蛋白質は同一である可能性が示唆された。さらに、本発明 DNAを用いて遺伝子工学的に発現させ、精製した蛋白質（遺伝子組み換え型 OBM）で作製したウサギ抗OBM ポリクローナル抗体は、前記の方法で得られる精製天然型蛋白質に交差性を有し、OBM とOCIFとの特異的結合を阻害するのと同様に、前記の精製天然型蛋白質とOCIFとの結合を特異的に阻害した。これらの結果から、本発明の DNAにより発現される遺伝子組み換え型蛋白質 OBMは、前記OCIFに特異的に結合する天然型蛋白質と同一であることが明らかである。

さらに本発明者らは、OCIFに特異的に結合し、天然型あるいは遺伝子組み換え型マウスOBM と同様にマウス脾臓細胞からの破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有するヒト由来OCIF結合蛋白分子（以下ヒトOBM と称する）をコードする遺伝子（cDNA）を単離するため、前述のとおりマウスOBM c DNAから作製したプライマーを用い、ヒトリンパ節由来 cDNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) を行い、得られたヒトOBM cDNA断片をプローブとして上記 cDNA ライブライマーをスクリーニングした。その結果、OCIFと特異的に結合するヒト由来蛋白質をコードする cDNA を分離することに成功し、このヒト由来OCIF結合蛋白分子、即ちヒトOBM をコードする cDNA の塩基配列を決定した。この cDNA に

コードされるヒトOBM は、マウスOBM と同様に細胞膜上でOCIFと強く、しかも特異的に結合する特性を有し、またマウス脾臓細胞からの破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有することを見出した。即ち、本発明は破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規なヒト由来蛋白質であるヒトOBM をコードする DNA、その DNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、その DNAを用いてOCIFに特異的に結合する性質を有し、マウス脾臓細胞からの破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝異常症治療剤の提供、更にヒトOBM の発現を調節する物質のスクリーニング方法、ヒトOBM と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、ヒトOBM と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法及びこれらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物を提供することを課題とする。

本発明は、OCIFに特異的に結合する特性を有し、また破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する新規なヒト蛋白質であるヒトOBM をコードする DNA、その DNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、その DNAを用いてOCIFに特異的に結合する特性を有し、また破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝異常症治療剤に関する。更に、本発明はヒトOBM の発現を調節する物質のスクリーニング方法、ヒトOBM と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、ヒトOBM と結合しOBM の生物活性を伝達するレセプターのスクリーニング方法、及びこれらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物、さらにヒト由来OCIF結合蛋白質に対する抗体及びその抗体を用いた骨代謝異常症の予防及び／又は治療薬に関する。

本発明の DNAによりコードされる新規ヒト由来OCIF結合蛋白分子、即ちヒトOB

Mは、以下の物理化学的性質及び生物活性を示す。

即ち、

- a. 破骨細胞形成抑制因子(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF) (WO 96/26217号)に特異的に結合する。
- b. 還元条件下でのSDS-PAGEによる分子量測定で、約40,000(\pm 5,000)の分子量を示す。又、モノマータイプのOCIFとクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は約90,000 - 110,000である。
- c. 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する。

ものである。

本発明のヒトOBMをコードするcDNAを分離同定するための、プローブとして使用するマウス由来OCIF結合蛋白質であるマウスOBM cDNAは、前述の方法に従って、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2のcDNAライブラリーから単離することができる。又、ヒトOBM cDNAを発現することにより得られる蛋白質の特性及びその生物活性を評価するために必要なヒト破骨細胞形成抑制因子OCIFは、WO 96/26217号記載の方法に従って、ヒト線維芽細胞株IMR-90の培養液から単離、あるいはそのDNAを用いて遺伝子工学的に製造することができる。ヒトOBMの特性や生物活性の評価には、遺伝子組み換えヒトOCIF、遺伝子組み換えマウスOCIF、遺伝子組み換えラットOCIF等を用いることもできる。これらの遺伝子組み換え型OCIFは、それぞれのcDNAを常法に従って発現ベクターに組み込み、CHO細胞、BHK細胞、Namalwa細胞等の動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製することによって得ることができる。

目的の蛋白質をコードするヒト型のcDNAを単離する(cDNAクローニング)方法としては、①その蛋白質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定し、それに対応する塩基配列を有するDNAをプローブとして用い、ハイブリダイゼーション法

により目的の cDNA を単離する方法、②目的の蛋白質のアミノ酸配列が不明であっても発現ベクター中に cDNA ライブラリーを構築し、それらを細胞中に導入し、目的蛋白質の発現の有無をスクリーニングすることにより、目的の cDNA を単離する方法（発現クローニング法）、及び③ヒト由来の目的蛋白質と同じ特性及び生物活性を有するヒト以外の哺乳動物由来の蛋白質をコードする遺伝子、cDNA がクローニングしようとするヒト由来の目的蛋白質の cDNA と高いホモロジーを有すると想定し、前者の cDNA をプローブとし、ヒト細胞あるいは組織から構築した cDNA ライブラリーからハイブリダイゼーション法や polymerase chain reaction (PCR) 法により目的のヒト蛋白質をコードする cDNA を単離する方法がある。

ヒトOBM cDNA は、前記マウスOBM cDNA と高い相同意を有するとの想定のもと、ヒトOBM 產生細胞あるいは組織は後者の cDNA をプローブとして、ノーザンハイブリダイゼーション法により調べることができる。ヒトOBM cDNA は、マウスOBM cDNA から作製したマウスOBM プライマーを用い、上記のようにして同定したヒト OBM 产生組織、例えばヒトリンパ節等から構築した cDNA を鋳型として、PCR によりヒトOBM cDNA断片を得て、このヒトOBM cDNA断片をプローブとし、上記の様に同定したヒトOBM 产生細胞あるいは組織の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。本発明は、このようにして得られたOCIF に特異的に結合する性質を有し、また破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有するヒト由来蛋白質、即ちヒトOBM をコードする DNA に関する。本発明の DNA がコードするヒトOBM は、膜貫通領域を有する膜結合型蛋白質をコードすることから、OCIF を標識し、本発明の cDNA を発現した動物細胞表面への OCIF 標識体の結合によって検出することができる。OCIF の標識法としては、前述と同様、放射性同位元素による標識や蛍光標識等、一般的な蛋白質の標識法を用いることができる。

本発明のヒトOBM cDNAにより発現される蛋白質の分子量は、ゲルfiltrationクロマトグラフィーやSDS-PAGE等を用いて測定される。より正確に分子量を測定するためには、SDS-PAGEを用いるのが好ましく、ヒトOBM は、還元条件下で約 40,000 (40,000 ± 5,000)の分子量を有する蛋白質として特定される。

本発明でいう比較的温和な条件での DNAハイブリダイゼーションとは、例えば常法に従いナイロンメンブランに DNAをトランスファーし、固定化した後、ハイブリダイゼーション用バッファー中で放射線標識したプローブの DNAと40-70 °C、2 時間から一夜程度ハイブリダイゼーションさせ、0.5 × SSC (0.075 M 塩化ナトリウム及び0.0075 M クエン酸ナトリウム) で45°C、10分間洗浄する条件を言う。より具体的には、常法に従い、ナイロンメンブランにハイボンドN (アマシャム社) を用い、DNAをトランスファーし、固定化した後、Rapid Hybridization Buffer (アマシャム社) 中で³²P標識したプローブの DNAと65°C、2 時間ハイブリダイゼーションさせて、上記の0.5 × SSCで45°C、10分間洗浄する条件を言う。

破骨細胞形成の代表的なインビトロ培養系として、活性型ビタミンD₃あるいはPTH の存在下でのマウス由来骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 とマウス脾臓細胞との共培養系がよく知られている。このインビトロ培養系での破骨細胞形成には、骨芽細胞様ストローマ細胞と脾臓細胞間の接着による相互作用及び活性型ビタミンD₃やPTH 等の骨吸収促進因子の存在が不可欠である。このインビトロ培養系において、骨吸収促進因子非存在下で、しかも破骨細胞形成支持能のないサル腎臓細胞株である COS細胞に本発明の cDNA を発現させた遺伝子組み換え COS細胞株は、骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 と同様に脾臓細胞からの破骨細胞形成支持能を獲得した。また本発明の cDNA は膜結合型蛋白質をコードすることから、この膜結合部位をコードする部分を除去することにより分泌型、可溶型とし

て発現させることもできる。骨吸収促進因子非存在下の上記インビトロ培養系に、この分泌型ヒトOBM を添加するだけで破骨細胞の形成が起こることも確認された。これらの結果から、本発明の cDNA によりコードされるヒトOBM は破骨細胞の分化、成熟に関する因子として特定される。

本発明の cDNA を発現ベクターに挿入してヒトOBM 発現プラスミドを作製し、これを各種の細胞または菌株に導入して発現させることにより、組み換え型ヒトOBM を製造することができる。発現させる際の哺乳動物細胞の宿主として COS-7、CHO 、 Namalwa 細胞などを、また細菌の宿主として大腸菌等を用いることができる。その際、cDNAの全長を用いて膜結合型蛋白質として発現させることができるし、また膜結合部位をコードする部分を除去することにより分泌型、可溶化型としても発現させることができる。このようにして製造された組み換え型ヒトOBM は、通常用いられる蛋白精製法、例えばOCIF固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーやゲルfiltrationクロマトグラフィー等を組み合わせることにより効率良く精製できる。このようにして得られた本発明ヒトOBM は、その活性より骨代謝異常症、例えば大理石病などの治療剤としての医薬、あるいは研究・診断用試薬として有用である。

本発明の cDNA にコードされる蛋白質、ヒトOBM を利用することにより、①ヒトOBM の発現を調節する物質のスクリーニング、②ヒトOBM に特異的に結合し、その生物活性を阻害あるいは修飾する物質のスクリーニング、及び③ヒト破骨細胞前駆細胞に存在し、ヒトOBM の生物活性を伝達するヒト蛋白質（ヒトOBM レセプター）のスクリーニング、さらにはこのヒトOBM レセプターを利用したアンタゴニストやアゴニストの開発が可能である。上述のヒトOBM あるいはヒトOBM レセプターを用いたコンビナトリアルケミストリーにおいて、アンタゴニストあるいはアゴニストの探索に必要なペプチドライブラリーはマウスOBM を用いたスク

リーニングの方法と同様の方法で作製することができ、マウスOBM の代わりにヒトOBM を用いて、ペプチドライブラーを同様にスクリーニングすることにより、特異的かつ極めて高親和性のペプチドを得ることができる。

さらにまた、前述のようにOBM は有用性の高い蛋白質であるが、この蛋白質の測定を行うにはOBM を特異的に認識する抗体とその抗体を用いた酵素免疫測定法の構築が必須である。しかしながら、これまでにOBM の測定に有用な抗体は得られていない。さらに、OBM あるいはs OBM の生物活性を中和する抗OBM/sOBM抗体は、OBM あるいはs OBM の作用、即ち破骨細胞形成の促進作用を抑制することが想定され、骨代謝異常症の治療薬としての開発が期待されるが、このような抗体も未だ得られていない。

上述の状況に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、破骨細胞形成抑制因子(OCIF)に特異的に結合する膜結合蛋白質(OCIF結合分子; OBM)及び膜結合部位を欠損した可溶性OBM(sOBM)の両抗原を認識する抗体(抗OBM/sOBM抗体)を見出すに至った。従って本発明は、破骨細胞形成抑制因子OCIFに特異的に結合する膜結合蛋白質OBM 及び膜結合部位を欠損した可溶性OBM(sOBM)の両抗原を認識する抗体(抗OBM/sOBM抗体)、その製造方法、この抗体を用いたOBM 及び sOBM の測定方法、さらにこの抗体を有効成分とする骨代謝異常症予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

本発明は、破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF)に特異的に結合する膜結合蛋白質(OCIF binding molecule; OBM)及び膜結合部位を欠損した可溶性OBM(sOBM)の両抗原を認識する抗体(抗OBM/sOBM抗体)、その製造方法、この抗体を用いたOBM 及び sOBM の測定方法、さらにこの抗体を有効成分とする医薬、特に骨代謝異常症予防及び／又は治療剤に関する。

本発明の抗体は、OBM 及び sOBM の生物活性である破骨細胞形成促進活性を中

和する活性を有し、以下の性質を持つ抗体から構成される。

即ち、

- a) マウスOBM 及びマウスsOBM の両抗原を認識するポリクローナル抗体（抗マウスOBM /sOBM ポリクローナル抗体）
- b) ヒトOBM 及びヒト s OBM の両抗原を認識するポリクローナル抗体（抗ヒトOBM /sOBM ポリクローナル抗体）
- c) マウスOBM 及びマウス s OBM の両抗原を認識するモノクローナル抗体（抗マウスOBM /sOBM モノクローナル抗体）
- d) ヒトOBM 及びヒト s OBM の両抗原を認識するモノクローナル抗体（抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体）
- e) マウスOBM 及びマウス s OBM の両抗原に交差性を有する抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体、から構成される。

マウスOBM 及びマウス s OBM の両抗原を認識するポリクローナル抗体（以下抗マウスOBM /sOBM ポリクローナル抗体と称する）及びヒトOBM 及びヒト s OBM の両抗原を認識するポリクローナル抗体（以下抗ヒトOBM /sOBM ポリクローナル抗体と称する）は、以下の手段によって得ることができる。免疫用抗原としての精製マウスOBM は、前述の方法に従って得ることができる。即ち、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST-2を活性ビタミンD₃処理し、その細胞膜上のOBM をOCT固定化カラム及びゲル濾過クロマトグラフィーにより精製することにより、天然型マウスOBM (nativeOBM)を得ることができる。又、前述のマウスOBM cDNA (配列表配列番号15) 又はヒトOBM cDNA (配列表配列番号12) を常法により発現ベクターに組み込み、CHO 細胞、BHK 細胞、Namalwa 、COS-7 細胞等の動物細胞、昆虫細胞、あるいは大腸菌などで発現させて、上記と同様の方法で精製することにより、遺伝子組み換えマウスOBM (配列表配列番号1) 又はヒトOBM(配

列表配列番号11)を得ることができ、これを免疫用抗原として用いても良い。この時、膜結合蛋白質であるマウスOBM あるいはヒトOBM を大量かつ高度に精製するには、多大の労力を要する。一方、膜結合型蛋白質であるOBM とその膜結合部位を欠損させて得られる可溶化蛋白質である可溶性OBM (sOBM)とは、前述のように破骨細胞の分化、成熟促進活性において差異がないことが認められている。従って、マウス s OBM 及びヒト s OBM は発現及びその高度精製が比較的容易であることから、これら可溶化蛋白質である s OBM を免疫用抗原として用いても良い。マウス s OBM (配列表配列番号16) 及びヒト s OBM (配列表配列番号17) は、マウス s OBM cDNA (配列表配列番号18) 又はヒト s OBM cDNA (配列表配列番号19) の5' 上流側に他の分泌蛋白質由来の既知シグナル配列をコードする塩基配列を付加し、上記と同様に遺伝子工学的手法により発現ベクターに組み込み、各種動物細胞、昆虫細胞、あるいは大腸菌などを宿主として発現し、精製することにより、それぞれ得ることができる。このようにして得られた免疫用抗原を、リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS)に溶解し、必要に応じ同容量のフロイント完全アジュvantと混合し乳化後、動物に約1週間間隔で皮下投与し、数回免疫する。抗体価を測定し、最高の抗体価に達した時点でブースター投与し、投与10日後に全採血を行う。得られた抗血清を硫酸アンモニウム分画沈澱し、グロブリン分画を陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製するか、あるいは抗血清をバインディングバッファー (Biorad社) で2倍希釈し、その希釈抗血清をプロテインA又はプロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製することにより、目的とする抗マウス又は抗ヒトOBM/sOBMポリクローナル型抗体を得ることができる。

本発明のモノクローナル抗体は、以下の方法により得ることができる。即ち、モノクローナル抗体の作製に必要な免疫用抗原としては、ポリクローナル抗体の時と同様に天然型マウスOBM (nativeOBM) 、遺伝子組み換えマウス型又はヒトOB

M、遺伝子組み換えマウス型又はヒト型sOBMを用いることができる。それぞれの抗原により哺乳動物を免疫するか、あるいはインビトロ法により免疫したリンパ球細胞を骨髄腫細胞株（ミエローマ）などと融合させ、常法によりハイブリドーマを作製する。このハイブリドーマ培養液について、高度に精製されたそれぞれの抗原を用いて、ソリッドフェーズELISAによりそれぞれの抗原を認識する抗体生産ハイブリドーマを選択する。得られたハイブリドーマをクローニングし、樹立した安定な抗体産生ハイブリドーマをそれぞれ培養することにより、目的とする抗体が得られる。ハイブリドーマの作製に当たっては、哺乳動物を使用する場合、マウスやラットなどの小動物を使用するのが一般的である。免疫は、抗原を適当な溶媒、例えば生理食塩水などで適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要に応じてフロイント完全アジュバントを併用投与し、動物に1～2週間間隔で3～4回程度投与する方法が一般的である。このようにして免疫された動物を最終免疫後3日目に解剖し、摘出した脾臓から得られた脾臓細胞を免疫細胞として使用する。免疫細胞と細胞融合するマウス由来のミエローマとしては、例えばp3/x63-Ag8、p3-U1、NS-1、MPC-11、SP-2/0、F0、P3x63 Ag8. 653及びS194などが挙げられる。又、ラット由来の細胞としては、R-210などの細胞株が挙げられる。ヒト型の抗体を生産する場合には、ヒトBリンパ球をインビトロで免疫し、ヒトミエローマ細胞やEBウイルスにより形質転換した細胞株と細胞融合させることにより、ヒト型の抗体を生産することができる。免疫された細胞とミエローマ細胞株との融合は公知の方法、例えばKohlerとMilsteinらの方法（Kohler et al.: Nature 256, 495-497, 1975）が一般的に使用されるが、電気パルスを利用した電気パルス法などでも良い。免疫リンパ球とミエローマ細胞株は、通常行われている細胞数の比率に混合し、一般に使用される牛胎児血清(FCS) 不含細胞培養用培地にポリエチレングリコールを添加して融合

処理を行い、FCS 添加HAT 選択培地で培養を行い融合細胞（ハイブリドーマ）を選別する。次に、抗体を生産するハイブリドーマをELISA、ブラーク法、オクタロニー法、凝集法など通常用いられる抗体の検出方法により選択し、安定なハイブリドーマを樹立する。このようにして樹立されたハイブリドーマは、通常の培養方法により継代培養可能であり、必要に応じて凍結保存できる。ハイブリドーマは常法により培養して、その培養液、または哺乳動物の腹腔内に移植することにより、腹水から抗体を回収することができる。培養液あるいは腹水中の抗体は、塩析法、イオン交換及びゲルfiltrationクロマトグラフィー、プロテインAまたはプロテインGアフィニティーコロマトグラフィーなど通常用いられる方法により精製することができる。このような方法により、抗原としてsOBM を用いて得られたモノクローナル抗体のほとんど全ては、sOBM だけでなくOBM をも特異的に認識できる抗体（抗OBM /sOBM モノクローナル抗体と称する）である。これらの抗体は、OBM 及びsOBM のそれぞれの測定に利用することができる。これらの抗体は放射性アイソトープや酵素ラベルすることにより、ラジオイムノアッセイ(RIA) やエンザイムイムノアッセイ(EIA) として知られている測定系に用いることにより、OBM 量及びsOBM 量を測定することができる。これらの測定系を用いることにより、血液、尿などの生体試料中のsOBM 量を容易にかつ高感度で測定することができる。また、これらの抗体を用いることにより、組織や細胞表面に結合したOBM 量をバインディングアッセイ等により容易にかつ高感度で測定することができる。

得られた抗体をヒトに対する医薬として用いる場合、抗原性の問題からヒト型抗ヒトOBM /sOBM 抗体を作製することが望ましい。ヒト型抗ヒトOBM /sOBM 抗体の作製は、次に述べるような手法により得ることができる。即ち、①ヒト末梢血あるいは脾臓から採取したヒトリンパ球をin vitroでIL-4存在下、抗原であるヒ

トOBM あるいはヒトsOBMで感作し、感作したヒトリンパ球をマウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₅H₆/B₅ (ATCC CRL1823)と細胞融合させることにより、目的の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングする。得られた抗体産生ハイブリドーマが生産する抗体は、ヒト型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体である。これらの抗体の中からヒトOBM /sOBM の活性を中和する抗体を選別する。しかしながら、このようにヒトリンパ球をin vitroで感作する方法では、一般的に抗原に対して高親和性の抗体を得るのは困難である。従って、ヒトOBM およびsOBMに高親和性のモノクローナル抗体を得るには、上記のようにして得られた低親和性ヒト型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体を高親和化する必要がある。それには、上記のようにして得られ、中和抗体であるものの低親和性であるヒト型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体のCDR領域（特にCDR-3）にランダム変異を導入し、これをファージで発現させてヒトOBM /sOBM を固相化したプレートを用いてファージディスプレイ法により、抗原であるヒトOBM /sOBM に強力に結合するファージを選択し、そのファージを大腸菌で増やし、その塩基配列から高親和性を有するCDRのアミノ酸配列を決定すればよい。このようにして得られたヒト型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体をコードする遺伝子を一般的に使用されている哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込んで、発現させることによりヒト型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体が得られる。これらの中から、ヒトOBM /sOBM の生物活性を中和し、かつ高親和性である目的のヒト型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体を選別することができる。また、②Balb/cマウスを用いて、本発明と同じように常法 (Koehler et al.: Nature 256, 495-497, 1975)によりマウス型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体を作製し、ヒトOBM /sOBM の生物活性を中和し、かつ高親和性を有するモノクローナル抗体を選択する。この高親和性マウス型抗ヒトOBM /sOBM モノクローナル抗体のCDR-領域（CDR-1, 2および3）をヒ

ト IgG の CDR 領域に移植する CDR-grafting (Winter and Milstein: Nature 349, 293-299, 1991)の手法を駆使することによりヒト型化が可能である。上記に加え、さらに③ヒト末梢血リンパ球をSevere combined immune deficiency (SCID)マウスに移植し、この移植されたSCIDマウスはヒト型抗体を生産する(Mosier D. E. et al.: Nature 335, 256 - 259, 1988; Duchosal M.A. et al.: Nature 355, 2 58-262, 1992)ので、抗原としてヒトOBM あるいはsOBMを抗原として感作し、スクリーニングすることにより、ヒトOBM /sOBM に特異的なヒト型モノクローナル抗体を生産するリンパ球をそのマウスから採取することができる。得られたリンパ球を前述のヒト型抗体の作製法①と同様に、マウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₆H₆/B₅ (ATCC CRL1823)と細胞融合させ、得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを得ることができる。このようにして得られたハイブリドーマを培養することにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を大量に製造でき、上述の方法と同様に精製することにより精製品を得ることができる。又、目的のヒト型モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマから cDNA ライブラリーを構築し、目的のヒト型モノクローナル抗体をコードする遺伝子（c DNA）をクローニングし、この遺伝子を遺伝子工学的手法により適当な発現ベクターに組み込み、各種動物細胞、昆虫細胞、あるいは大腸菌などを宿主として発現させることにより、遺伝子組み換えヒト型モノクローナル抗体を大量に製造することができる。得られた培養液から上述と同様の方法により精製することにより、精製されたヒト型モノクローナル抗体を大量に得ることができる。

さらに、上述の方法で得られた抗OBM /sOBM モノクローナル抗体の中から、OBM /sOBM の生物活性を中和する抗体が得ることができる。これらOBM /sOBM の生物活性を中和する抗体は、生体内でのOBM /sOBM の生物作用、即ち破骨細胞形成

促進作用をブロックすることから、医薬として、特に骨代謝異常症の予防及び／又は治療剤として期待される。抗OBM /sOBM 抗体によるOBM あるいはs OBM の生物活性の中和活性は、 *in vitro* での破骨細胞形成系における破骨細胞形成の抑制活性で測定することができる。*in vitro* アッセイ系として、以下の3 つの方法がある。即ち、破骨細胞形成 (osteoclastogenesis) の*in vitro* 培養系として、①活性型ビタミンD₃とデキサメサゾンの存在下、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 細胞とマウス脾臓細胞との共培養系、②サル腎臓細胞株、COS-7 細胞上にOBM を発現させ、ホルムアルデヒドにより固定化し、M-CSF 存在下、その細胞上でマウス脾臓細胞を培養する共培養系、③遺伝子組み換え s OBM 及びM-CSF 存在下でマウス脾臓細胞を培養する系などが挙げられる。これら培養系に種々の濃度で抗OBM /sOBM 抗体を添加し、破骨細胞形成に及ぼす影響を調べることにより、抗OBM /sOBM 抗体による破骨細胞形成抑制活性を測定することができる。又、*in vivo* での実験動物を利用した骨吸収抑制活性により抗OBM /sOBM 抗体の破骨細胞形成抑制活性を評価することができる。即ち、破骨細胞形成が亢進している動物モデルとして、卵巣摘出モデルがある。この種の実験動物に抗OBM /sOBM 抗体を投与し、骨吸収抑制活性（骨密度の増強活性）を測定することにより、抗OBM /sOBM 抗体による破骨細胞形成抑制活性を測定することができる。

このようにして得られたOBM /sOBM の生物活性を中和する抗体は、医薬として、特に骨代謝異常症の予防及び／又は治療を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。本発明抗体は、製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。本発明抗体を含む製剤は、OBM 及び／又はs OBM を認識する抗体を有効成分として含有する医薬組成物として、ヒトあるいは動物に対し安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが

挙げられる。モノクローナル抗体は高分子蛋白質であることから、バイアル瓶などのガラス容器や注射筒などへの吸着が著しい上に不安定であり、種々の物理化学的因素、例えば熱、pHおよび湿度等により容易に失活する。従って、安定な形で製剤化するために、安定化剤、pH調整剤、緩衝剤、可溶化剤、界面活性剤などを添加する。安定化剤としては、グリシン、アラニン等のアミノ酸類、デキストラン40およびマンノース等の糖類、ソルビトール、マンニトール、キシリトル等の糖アルコール等が挙げられ、またこれらの二種以上を併用してもよい。これらの安定化剤の添加量は、抗体の重量に対して0.01～100倍、特に0.1～10倍添加するのが好ましい。これら安定化剤を加えることにより、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の保存安定性を向上することができる。緩衝剤としては、例えばリン酸バッファー、クエン酸バッファー等が挙げられる。緩衝剤は、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水溶液のpHを調整し、抗体の安定性、溶解性に寄与する。緩衝剤の添加量としては、例えば液状製剤あるいは凍結乾燥製剤を再溶解した後の水量に対し、1～10mMとするのが好ましい。界面活性剤としては、好ましくはポリソルベート20、フルロニックF-68、ポリエチレングリコール等、特に好ましくはポリソルベート80が挙げられ、またこれらの2種以上を併用してもよい。抗体のような高分子蛋白質は容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすい。従って、界面活性剤を添加することによって、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体の、容器への吸着を防止することができる。界面活性剤の添加量としは、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水重量に対し0.001～1.0%添加することが好ましい。以上のような安定化剤、緩衝剤、あるいは吸着防止剤を加えて本発明抗体の製剤を調製することができるが、特に医療用又は動物薬用注射剤として用いる場合は、浸透圧比として許容される浸透圧比は1～2が好ましい。浸透圧比は、製剤化に際して塩化ナトリウムの増減により調製

することができる。製剤中の抗体含量は、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜調整することができ、ヒトに対するヒト型化抗体の投与量は、抗体のヒトOBM /sOBM に対する親和性、即ちヒトOBM /sOBM に対する解離定数（Kd値）に依存し、親和性が高い（Kd値が低い）ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発現することができる。又、ヒト型抗体はヒト血中での半減期が約20日間と長いことから、例えばヒトに対して投与する際には、約0.1～100mg/kgを1～30日間に1回以上投与すれば良い。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明実施例3のマウスOBM蛋白質のSDS-PAGEの結果を示す。

〔符号の説明〕

(A) : レーン1：分子量マーカー

レーン2：活性型ビタミンD₃とデキサメサゾン存在下で培養したST2細胞からの部分精製標品（Gly-HCl(pH2.0)溶出画分）

レーン3：活性型ビタミンD₃とデキサメサゾン非存在下で培養したST2細胞からの部分精製標品（Gly-HCl(pH2.0)溶出画分）

(B) : レーン1：分子量マーカー

レーン2：逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した本発明マウスOBM蛋白質（実施例3）

第2図は、実施例4の¹²⁵Iで標識したOCIFの骨芽細胞様ストローマ細胞ST2への結合試験の結果を示す。

第3図は、実施例5(1)の継代数の違う骨芽細胞様ストローマ細胞ST2による破骨細胞形成支持能を示す。

〔符号の説明〕

1 : 継代数約10代のST2細胞の破骨細胞形成支持能

2：継代数約40代のST2細胞の破骨細胞形成支持能

第4図は、実施例5(2)の活性型ビタミンD₃及びデキサメサゾン存在下での培養における骨芽細胞様ストローマ細胞膜上の本発明蛋白質発現の経時変化を示す。

第5図は、実施例5(2)の共培養系における破骨細胞形成の経時変化を示す。

第6図は、実施例5(3)の共培養期間において、種々の培養期間のみOCIF処理した場合の破骨細胞形成抑制効果を示す。

第7図は、実施例6の¹²⁵I標識OCIFと本発明蛋白質とのクロスリンク試験の結果を示す。

(符号の説明)

レーン1：¹²⁵I標識OCIF-CDD1

レーン2：¹²⁵I標識OCIF-CDD1とST2細胞をクロスリンクさせたもの

レーン3：400倍濃度の未標識OCIFを添加してクロスリンクさせたもの

第8図は、実施例9における、SDS-PAGEの結果を示す。

(符号の説明)

レーン1：pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質を、OCIF無添加で免疫沈降させたもの

レーン2：pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質を、OCIFを添加して免疫沈降させたもの

第9図は、実施例10における、¹²⁵Iで標識したOCIFの、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞への結合試験の結果を示す。

(符号の説明)

レーン1及び2：¹²⁵Iで標識したOCIFの、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞への結合量

レーン3及び4：¹²⁵Iで標識したOCIFの、pOBM291をトランスフェクした

COS-7 細胞への結合量（400 倍濃度の未標識OCIF添加時）

第10図は、実施例11における、 ^{125}I で標識したOCIFを用いたクロスリンク試験の結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1： ^{125}I 標識OCIF

レーン2： ^{125}I 標識OCIFと、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7 細胞をクロスリンクさせたもの

レーン3：400倍濃度の未標識OCIF存在下で、 ^{125}I 標識OCIFと、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞をクロスリンクさせたもの

第11図は、実施例12における、ノーザンプロットの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1：ビタミンD及びデキサメサゾン無添加で培養したST2細胞由来RNA

レーン2：ビタミンD及びデキサメサゾンを添加し培養したST2細胞由来RNA

第12図は、実施例13-(2) における、OCIF濃度を変えた時の培養上清中蛋白質のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

○：pCEP4

●：pCEP sOBM

第13図は、実施例13-(2)における、培養上清の割合を変えた時の培養上清中蛋白質のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

○：pCEP4

●：pCEP sOBM

第14図は、実施例14-(2)における、大腸菌で発現させたチオレドキシンとマウ

マウスOBM の融合蛋白質のSDS-PAGEの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1：分子量マーカー

レーン2：GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分

レーン3：GI724/pTrxOBM25 由来可溶性蛋白質画分

第15図は、実施例14-(3)における、可溶性蛋白質画分の割合を変えた時のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

□： GI724/pTrxFus

○： GI724/pTrxOBM25

第16図は、実施例14-(3)における、OCIF濃度を変えた時の可溶性蛋白質画分（1 %）のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

□： GI724/pTrxFus

○： GI724/pTrxOBM25

第17図は、本発明のマウスOBM cDNAにより発現され精製して得られる蛋白質マウス OBM、及び天然型の精製OCIF結合蛋白質とOCIFとの特異的結合能の、ウサギ抗マウス OBM抗体による阻害結果を示す。

〔符号の説明〕

- 1： 抗体で処理したcDNAにより発現され精製して得られる蛋白質、 OBM+ ¹²⁵I-OCIF
- 2： 抗体で処理した天然型の蛋白質 + ¹²⁵I-OCIF
- 3： 抗体未処理のcDNAにより発現されて得られる蛋白質、マウスOBM + ¹²⁵I-OCIF
- 4： 抗体未処理の天然型の蛋白質 + ¹²⁵I-OCIF

5: 3 + 非標識OCIF (^{125}I - OCIFの400 倍量)

6: 4 + 非標識OCIF (^{125}I - OCIFの400 倍量)

第18図は、本発明のcDNAにより発現される蛋白質、ヒトOBM のSDS-PAGEの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1: 分子量マーカー

レーン2: 本発明のcDNAを含む発現ベクター、phOBM をトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質をOCIF無添加でウサギ抗OCIFポリクローナル抗体で免疫沈降させたもの

レーン3: 本発明cDNAを含む発現ベクター、phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質をOCIF添加でウサギ抗OCIFポリクローナル抗体で免疫沈降させたもの

第19図は、本発明cDNAを含む発現ベクター、phOBMをトランスフェクトしたCOS-7 細胞へのOCIFの結合試験の結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1: phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞に ^{125}I - OCIFを添加したもの

レーン2: phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞に ^{125}I - OCIFを添加し、さらに 400倍量の非標識OCIFを加えたもの

第20図は、本発明cDNAでコードされる蛋白質、ヒトOBM と ^{125}I - OCIF (モノマー型)とのクロスリンкиング試験の結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1: ^{125}I -OCIF

レーン2: ^{125}I -OCIFとphOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞膜上の蛋白

質とをクロスリンクさせたもの

レーン3: 400倍濃度の非標識OCIF存在下で、 ^{125}I - OCIFとphOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞膜上の蛋白質とをクロスリンクさせたもの

第21図は、実施例23-(2)における、OCIF濃度を変えた時の培養液上清中蛋白質（分泌型 hOBM）のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

○: 分泌型ヒトOBM をコードするcDNAを含まないベクターのみの pCEP4をトランスフェクトした293-EBNA細胞の培養液

●: 分泌型ヒトOBM をコードするcDNAを含む発現ベクターの pCEPshOBMをトランスフェクトした293-EBNA細胞の培養液

第22図は、実施例23-(2)における、OCIF濃度を一定にし、添加する培養液量を変えた時の培養液上清中蛋白質（分泌型ヒトOBM）のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

○: 分泌型ヒトOBM をコードするcDNAを含まないベクターのみの pCEP4をトランスフェクトした293-EBNA細胞の培養液

●: 分泌型ヒトOBM をコードするcDNAを含む発現ベクターの pCEPshOBMをトランスフェクトした293-EBNA細胞の培養液

第23図は、大腸菌で発現させたチオレドキシンとヒトOBM の融合蛋白質のSDS-PAGEの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1: 分子量マーカー

レーン2: 大腸菌GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分

レーン3: 大腸菌GI724/pTrxhOBM由来可溶性蛋白質画分

第24図は、実施例24-(3)における、チオレドトキシンとヒトOBM の融合蛋白質

を含む大腸菌由来可溶性蛋白質画分の添加割合を変えた時の融合蛋白質と、OCIFとの結合能を示す。

〔符号の説明〕

○：大腸菌GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分

●：大腸菌GI724/pTrxshOBM 由来可溶性蛋白質画分

第25図は、実施例24-(3)における、OCIF濃度を変えた時の大腸菌由来可溶性蛋白質画分中のチオレドトキシンとヒトOBM の融合蛋白質と、OCIFとの結合能を示す。

〔符号の説明〕

○：大腸菌GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分

●：大腸菌GI724/pTrxshOBM 由来可溶性蛋白質画分

第26図は、本発明のウサギ抗ヒトOBM/sOBMポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによる、ヒトOBM 及びsOBMの測定結果を示す。

〔符号の説明〕

□：ヒトOBM

●：ヒト s OBM

第27図は、本発明の抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによる、ヒトOBM 及びsOBMの測定結果を示す。

〔符号の説明〕

□：ヒトOBM

●：ヒトsOBM

第28図は、本発明のマウスOBM 及びsOBMにも交差性を有する抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによる、マウスOBM 及びsOBMの測定結果を示す。

[符号の説明]

□ : マウスOBM

● : マウス sOBM

第29図は、チオレドトキシンとマウスOBM の融合蛋白質によるヒト破骨細胞様細胞形成の促進活性を示す。

第30図は、ビタミンD₃刺激による骨吸収活性の、抗OBM/sOBM抗体による抑制を示す。

第31図は、プロスタグランジンE₂(PGE₂)刺激による骨吸収活性の、抗OBM/sOBM抗体による抑制を示す。

第32図は、副甲状腺ホルモン(PTH) 刺激による骨吸収活性の、抗OBM/sOBM抗体による抑制を示す。

第33図は、インターロイキン1 α (IL-1)刺激による骨吸収活性の、抗OBM/sOBM抗体による抑制を示す。

発明を実施するための最良の形態**[実施例]**

以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[実施例 1]**本発明蛋白質の製造****(1) ST2細胞の大量培養**

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2 (RIKEN CELL BANK, RCB0224)は、10%牛胎児血清を含む α -MEM培地を用いて培養した。付着細胞用225cm² T フラスコでコンフルエントになるまで培養したST2細胞を、トリプシン処理してT フラスコから剥がし洗浄した後、5 枚の225cm² T フラスコに移し、10⁻⁸M活性型ビタミン

D₃(Calcitriol)、10⁻⁷Mデキサメサゾン、及び10%牛胎児血清を添加したα-ME M培地各々60mlを加えてCO₂ インキュベーター中で7-10日間培養した。培養したST2細胞はセルスクレイパーを用いて回収し、使用するまで -80°Cで保存した。

(2) 膜画分の調製と膜結合蛋白質の可溶化

225cm²のTフラスコ80枚を用いて培養した実施例1-(1)記載のST2細胞（容量約12ml）に、プロテアーゼ阻害剤（2mM APMSFP, 2mM EDTA, 2mM o-phenanthroline, 1 mM leupeptin, 1 μg/ml pepstatin A及び100 units/ml aprotinin）を含む10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)を3倍容量（36ml）加えた。ボルテックスミキサーを用いて30秒間この細胞を激しく攪拌した後、氷中で10分間放置した。ホモジナイザー (DOUNCE TISSUE GRINDER, A syringe, WHEATON SCIENTIFIC 社) を用い、細胞を破碎した。この細胞破碎液に、上記のプロテアーゼ阻害剤、0.5M シュクロース、0.1 M 塩化カリウム、10 mM 塩化マグネシウム、及び2 mM 塩化カルシウムを加えた10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) の等量（48ml）を加え、攪拌した後、4 °C、600 × gで10分間遠心した。この遠心分離により、細胞核と未破碎の細胞を沈殿画分として分離した。遠心分離で得た上清を4 °C、150,000 × gで90分間遠心し、沈殿画分としてST2細胞の膜画分を得た。この膜画分に、上記のプロテアーゼ阻害剤、150 mM 塩化ナトリウム、及び0.1 M シュクロースを含む10mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)8 mlを加えた後、20% CHAPS (3-[(3-choleamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate、Sigma 社) 200 μlを加え、4 °Cで2 時間攪拌した。この液を4 °C、150,000 × gで60分間遠心し、その上清を可溶化膜画分として得た。

〔実施例2〕

本発明蛋白質の精製

(1) OCIF固定化アフィニティカラムの調製

HiTrap NHS-activatedカラム(1ml, ファルマシア社)内のイソプロパノールを1 mM塩酸で置換した後、W096/26217号公報記載の方法で調製した遺伝子組み換え型 OCIF 13.0mgを含む 0.2M NaHCO₃/0.5M NaCl(pH 8.3)溶液 1 mlをシリンジ(5ml, テルモ社)を用いカラムに添加した。室温で30分間カップリング反応させた後、過剰な活性基を不活性化する為、0.5Mエタノールアミン/0.5 M NaCl(pH 8.3)と0.1M酢酸/0.5M NaCl(pH 4.0)を3ml ずつ交互に3回流し、再度0.5 M エタノールアミン/0.5M NaCl(pH 8.3)に置き換え室温で1時間放置した。その後、0.5 M エタノールアミン/0.5M NaCl(pH 8.3)と0.1M酢酸/0.5M NaCl(pH 4.0)で2度洗浄し、50mM Tris/1M NaCl/0.1% CHAPS緩衝液(pH 7.5)に置換した。

(2) OCIF固定化アフィニティーカラムによる本発明蛋白質の精製

OCIF結合蛋白質の精製は、特に断らない限り4°Cで行った。前述のOCIF固定化アフィニティーカラムを、実施例1-(2)記載のプロテアーゼ阻害剤、0.15 M 塩化ナトリウム、及び0.5% CHAPSを加えた10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)で平衡化した。このカラムに、実施例1-(2)項記載の可溶化膜画分約8 mlを流速0.01 ml/分で負荷した。このカラムに、上記のプロテアーゼ阻害剤、0.15 M 塩化ナトリウム、及び0.5% CHAPSを加えた10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)を流速0.5 ml/分で100分間流してカラムを洗浄した。次に、プロテアーゼ阻害剤、0.2M 塩化ナトリウム、及び0.5% CHAPSを加えた0.1 M グリシン-塩酸緩衝液(pH 3.3)を流速0.1ml/分で50分間流し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。同様に、プロテアーゼ阻害剤、0.2 M 塩化ナトリウム、及び0.5% CHAPSを加えた0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0)を流速0.1ml/分で50分間流し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は0.5ml/フラクションにて分取した。分取した画分には、2Mトリス溶液を加え、直ちに中和した。各緩衝液で溶出したフラクション(溶出液量1.0-5.0ml)の各々をセントリコン-10(Centricon-10, Amicon, USA)を

用いて 50 から 100 μ l に濃縮した。濃縮した各フラクションの一部を分取し、それぞれに OCIF を添加後、OCIF ポリクローナル抗体で免疫沈殿させた。その沈殿画分を SDS 化して後、SDS-PAGE にかけて OCIF に特異的な結合能を有する蛋白質のバンドが出現するフラクション (Fr. No. 3-10) を本発明蛋白質画分とした。

(3) ゲル濾過による本発明蛋白質の精製

実施例 2-(2) 記載の方法で精製し、濃縮した OCIF 結合蛋白質 (0.1M グリシン - 塩酸緩衝液、pH 3.3 及び 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 2.0 溶出画分) を 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5% CHAPS (pH 7.0) で平衡化した Superose 12 HR10/30 カラム (ファルマシア社、1.0x 30cm) にかけ、平衡化緩衝液を移動相として用い流速 0.5 ml/min で展開させ、0.5 ml づつの画分を集めた。上記と同様にして本発明蛋白質画分 (Fr. No. 27-32) を同定し、各々のフラクションを Centricon-10 (Amicon) で濃縮した。

(4) 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

前述のゲル濾過で精製した OCIF 結合蛋白質を 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA), 30% アセトニトリルで平衡化した C₄ カラム (2.1x250mm、Vydac, USA) に負荷した。最初の 50 分間でアセトニトリル濃度を 30% から 55% に、次の 10 分間でアセトニトリル濃度を 80% にする勾配、流速 0.2 ml/min で溶出を行い、溶出された蛋白質のピークを 215 nm で検出した。溶出された各ピークの蛋白質を分取し本発明蛋白質のピークを同定することにより、高度に精製された本発明蛋白質を得た。

[実施例 3]

精製された本発明蛋白質の SDS-PAGE

まず、活性型ビタミン D₃ 存在下あるいは非存在下で培養した ST2 細胞から調製した膜可溶化画分を上記のように OCIF 固定化アフィニティーカラムで精製し、その精製標品を SDS-PAGE にかけた。第 1 図 (A) に示したように、活性型ビタミン D₃

存在下で培養したST2細胞からの精製標品のみに、約30,000-40,000 のメジャーな蛋白質バンドが検出され、OCIF固定化アフィニティーカラムにより、OCIFに特異的に結合する蛋白質、即ち本発明蛋白質が選択的に濃縮、精製されることが明らかになった。しかしながら、本発明蛋白質以外にOCIF固定化カラムの担体やスペーサーなどに非特異的に結合した数種の蛋白質バンドが両精製サンプル中に共通して検出された。これらの本発明蛋白質以外の蛋白質を上記のようにゲル濾過及びC4逆相クロマトグラフィーで除去し、得られた高度精製本発明蛋白質のSDS-PAGEを第1図(B)に示した。高度精製本発明蛋白質は電気泳動的に均一であり、その分子量は約 30,000 - 40,000であった。

〔実施例 4〕

OCIFの骨芽細胞への結合試験

(1) ^{125}I 標識OCIFの調製

OCIFはヨードジエン(Iodogen) 法により ^{125}I 標識した。即ち、2.5mg/ml Iodogen-クロロホルム溶液20 μl を1.5 mlエッペンドルフチューブに移し、40°Cでクロロホルムを蒸発させて、ヨードジエンコートしたチューブを調製した。このチューブを 0.5M リン酸ナトリウム緩衝液 (Na-Pi, pH 7.0) 400 μl で3 回洗浄した後、0.5M Na-Pi, pH7.0, 5 μl を加えた。このチューブにNa- ^{125}I 溶液(Amersham 社、NEZ-033H20) 1.3 μl (18.5 MBq) を加えた後、直ちに 1 mg/ml rOCIF 溶液（モノマー型あるいはダイマー型）10 μl を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温で30秒間放置した。この溶液を、予め 10 mg/ml ヨウ化カリウム、0.5 M Na-Pi, pH 7.0 溶液 80 μl と 5% 牛血清アルブミンのリン酸塩緩衝生理食塩水 5 μl を添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液を0.25%牛血清アルブミンのリン酸塩緩衝生理食塩水溶液で平衡化しておいたスピンドラム (1ml, G-25 fine, ファルマシア社) に負荷し、2,000 rpm で5 分間遠心し

た。カラムから溶出された画分に0.25%牛血清アルブミンのリン酸塩緩衝生理食塩水溶液 400 μ l を加え攪拌した後、2 μ l を取り、その放射能をガンマーカウンターで測定した。このようにして調製した 125 I 標識OCIF溶液の放射化学純度は10% TCAにより沈殿する画分の放射能を測定することにより求めた。又、 125 I 標識OCIF溶液のOCIF生物活性は、W096/26217号公報記載の方法に従い測定した。又、 125 I 標識OCIF濃度は以下のようにELISAにより測定した。

(2) 125 I 標識OCIF濃度のELISAによる測定

W096/26217号公報記載の抗OCIFウサギポリクローナル抗体を2 μ g/mlになるよう溶解させた 50mM NaHCO₃ (pH 9.6) 100 μ l づつを96ウェルイムノプレート (MaxiSorpTM、Nunc社) の各ウェルに加えて4 °Cで一夜放置した。この液を吸い取った後、ブロックエース(雪印乳業)／リン酸塩緩衝生理食塩水溶液 (25/75) 300 μ l づつを各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、各ウェルを0.01%ポリソルベート80を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(P-PBS) で3回洗浄し、次いで 125 I 標識OCIFサンプルあるいはOCIF標準品を添加したブロックエース／リン酸塩緩衝生理食塩水溶液 (25/75) 300 μ l づつを各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS 200 μ l で各ウェルを6回洗浄した。パーオキシダーゼ標識したウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を含むブロックエース(雪印乳業)／リン酸塩緩衝生理食塩水溶液 (25/75) 100 μ l づつを各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS 200 μ l で各ウェルを6回洗浄した。TMB 溶液 (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek 社) 100 μ l づつを各ウェルに加え、室温で2-3分放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek 社) 100 μ l づつを各ウェルに加えた。各ウェルの 490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。OCIF標準品を用いて作製した検量線より、 125 I 標識OCIFの濃度を求めた。

(3) OCIFの骨芽細胞あるいは脾臓細胞への結合試験

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2あるいは脾臓細胞をそれぞれ 4×10^4 cell/ml 及び 2×10^6 cell/ml の濃度になるように、 10^{-8} M活性型ビタミンD₃(Calcitriol)及び 10^{-7} Mデキサメサゾン添加あるいは無添加の10%牛胎児血清(FBS)を含む α -MEM培地に懸濁させ、この培地 1mlずつを24ウェルマイクロプレートに播種した。細胞をCO₂インキュベーター中で4日間培養し α -MEM培地で洗浄した後、上記の¹²⁵I標識OCIF(モノマー型又はダイマー型) 20ng/mlを加えた結合試験用培地(0.2%牛血清アルブミン、20 mM Hepes緩衝液、0.2%NaN₃を加えた α -MEM培地) 200 μlを各ウェルに加えた。又、別のウェルには、8 μg/ml rOCIF(400倍濃度)を更に添加した結合試験用培地を 200 μg/ml 加え、非特異的吸着量測定に供した。CO₂インキュベーター中で1時間培養した後、1 mlのリン酸塩緩衝生理食塩水 1mlで3回洗浄した。この際、脾臓細胞は浮遊細胞であるため、24ウェルプレートを遠心分離しながら、各ウェルの細胞を洗浄した。洗浄後、0.1 N NaOH溶液 500 μlを各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、細胞に結合したRI量をガンマカウンターで測定した。

¹²⁵I標識OCIFは、培養した脾臓細胞には結合せず、第2図に示したように、活性型ビタミンD₃で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞にのみ特異的に結合した。このことから、本発明蛋白質は活性型ビタミンD₃とデキサメサゾンにより骨芽細胞様ストローマ細胞上に誘導される膜結合蛋白質であることが明らかになった。

[実施例5]

本発明蛋白質の生物活性

(1) 骨芽細胞様ストローマ細胞の破骨細胞形成支持能

骨芽細胞の破骨細胞形成支持能は、形成される破骨細胞の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP活性)を測定することによって評価した。即ち、ddyマ

ウス(8-12 週齢) の脾臓細胞(2×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$ /well)とマウス骨芽細胞様ストローマ細胞 ST2(5×10^3 cells/ $100 \mu\text{l}$ /well) を 10^{-8}M 活性型ビタミンD₃、 10^{-7}M デキサメサゾン、及び10%牛胎仔血清を加えた α -MEM培地に懸濁させ、96ウェルプレートに播種した。CO₂ インキュベーター中で1週間培養した後、各ウェルをリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄し、更に $100 \mu\text{l}$ のエタノール/アセトン(1:1) を加えて、室温で1分間固定した。固定後、5.5 mM p-nitrophenol phosphataseと 10mM 酒石酸ナトリウムを含む 50mM クエン酸緩衝液、pH 4.5、 $100 \mu\text{l}$ を各ウェルに加え、室温で15分間反応させた。反応後、0.1 N NaOH溶液を各ウェルに添加し、405 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。RIKEN CELL BANK から購入した後の継代数約10代のST2 細胞と継代数約40代のST2 細胞の破骨細胞形成支持能を試験した結果を第3図に示す。この結果から、継代数の多いST2 細胞は破骨細胞形成支持能が高いことが明らかになった。

(2) 活性型ビタミンD₃ 及びデキサメサゾン存在下での培養における骨芽細胞様ストローマ細胞膜上の本発明蛋白質発現の経時変化と共培養系における破骨細胞形成の経時変化

実施例4-(3)と同様に、骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2を活性型ビタミンD₃ 及びデキサメサゾン存在下で7日間培養した。OCIF結合試験は、実験例4-(1)に記載した ¹²⁵I 標識OCIF(モノマータイプ)を用いて行った。非特異的結合は400倍濃度の非標識OCIFを用いて ¹²⁵I 標識OCIFのST2細胞への結合を競合させることにより測定した。その結果、活性型ビタミンD₃とデキサメサゾンにより、培養日数の経過と共に ¹²⁵I 標識OCIFの特異的結合量が上昇した。即ち、第4図及び第5図に示したように本発明蛋白質は活性型ビタミンD₃によりST2 細胞の表面に培養日数と共に発現し、その発現は培養4日目に最大に達した。一方、マウス脾臓細胞とST2 細胞の共培養を活性型ビタミンD₃存在下で行うことにより、破骨

細胞様の細胞が形成される。破骨細胞のマーカー酵素であるTRAP陽性の単核前破骨細胞様細胞は培養3、4日目には形成され、さらに分化、成熟したTRAP陽性の多核細胞は培養5、6日目に形成される。本発明蛋白質の発現の経時変化と破骨細胞形成のそれとは良く相関していることが明らかになった。

(3) 共培養期間において、種々の培養期間のみOCIF処理した場合の破骨細胞形成抑制効果

本発明蛋白質が破骨細胞形成に関与する因子であることを更に明確にするために、前述の実施例5-(2)における6日間の共培養期間において、種々の培養期間（各2日間、但し5日目のみ1日間）の細胞を、100 ng/ml のOCIFで処理した。その結果、第6図に示したように、ST2 細胞上に最も本発明蛋白質が発現される培養48-96時間目でのOCIF処理が最も効果的に破骨細胞の形成を抑制した。即ち、OCIFは本発明蛋白質を介してST2 細胞に結合することにより、破骨細胞形成を抑制することが明らかになった。

以上の結果から、本発明蛋白質は活性型ビタミンD₃とデキサメサゾンにより骨芽細胞様ストローマ細胞膜上に誘導され、破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する因子としての生物活性（作用）を有することが明らかになった。

[実施例6]

¹²⁵I 標識OCIFと本発明蛋白質とのクロスリンキング試験

本発明蛋白質の存在をさらに確認するため、¹²⁵I 標識OCIFと本発明蛋白質とのクロスリンキングを行った。実施例4-(3)と同様にマウス骨芽細胞様細胞株ST2を活性型ビタミンD₃及びデキサメサゾン存在下及び非存在下で4日間培養した。細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水 1mlで洗浄した後、上記の¹²⁵I 標識OCIF（モノマー型）25 ng/ml、又はW096/26217号公報にある配列表配列番号76記載の蛋白質を動物細胞で発現させ上記の方法で標識することにより得られた¹²⁵I 標識OCIF

-CDD1 40ng/ml を加えた結合試験用培地(0.2%牛血清アルブミン、20mM Hepes 緩衝液、0.2 % NaN₃、及び 100 μg/mlヘパリンを加えたα-MEM培地)200 μl を添加した。又、別のウェルには、400 倍濃度のOCIFを更に添加した結合試験用培地を添加し、非特異的吸着試験に供した。CO₂ インキュベーター中で1時間培養した後、100 μg/mlヘパリンを加えたリン酸塩緩衝生理食塩水 1mlで3回洗浄した。これらのウェルに 100 μg/mlのクロスリンクング剤、DSS (Disuccinimidyl suberate、Pierce社) を溶解させたリン酸塩緩衝生理食塩水 500 μl を加え、0 °Cで10分間反応させた。これらのウェルの細胞を 0 °Cに冷却したリン酸塩緩衝生理食塩水 1mlで2回洗った後、1 % Triton X-100 、2mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)、10 μM pepstatin 、10 μM leupeptin 、10 μM antipain、及び 2mM EDTA を加えた 20 mM Hepes緩衝液 100 μl を各ウェルに加え室温に30分間放置して細胞を溶解させた。これらのサンプル15 μl を常法により非還元条件下で SDS化した後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用ゲル(4-20 %ポリアクリルアミドグラジエント、第一化学社)を用いて泳動させた。泳動後、ゲルを乾燥させ、BioMax MS フィルム (Kodak 社) と BioMax MS 増感スクリーン(Kodak社)を用いて-80 °Cで24時間感光させた。感光させたフィルムを常法により現像した。
¹²⁵I 標識OCIF (モノマー型、60kDa)を用いた場合には分子量約 90,000-110,000 のクロスリンクされた蛋白質が検出された。又、¹²⁵I 標識OCIF-CDD1 (31 kDa)を用いた場合、第7図に示すように約 70-80kDa(平均 78 kDa)のクロスリンクされた蛋白質が検出された。

〔実施例7〕

ST細胞上に発現する本発明蛋白質のScatchard Plotによる解析

上記の ¹²⁵I 標識OCIF (モノマー型) を 1,000 pM になるように加えた結合試験用培地(0.2%牛血清アルブミン、20mM Hepes 緩衝液、0.2 % NaN₃ を加えた

α -MEM培地)を調製し、結合試験用培地を用い、1/2希釈倍率で段階的に希釈した。又、非特異的な結合を求めるため、これらの溶液に更に400倍濃度の未標識モノマー型OCIFを添加した溶液を調製した。調製したこれらの溶液200 μ lを 10^{-8} M活性型ビタミンD₃(Calcitriol)と 10^{-7} Mデキサメサゾン存在下で4日間培養した上記のST2細胞(約10継代目)のウェルに加え、実施例4-(3)と同様の方法で 125 I標識OCIFの結合を試験した。得られた結果を常法に従ってScatchard Plotし、OCIFとOCIF結合蛋白質の解離定数とST2細胞当たりのOCIF結合蛋白質の個数(サイト数)を求めた。その結果、OCIFと本発明蛋白質の解離定数は280pM、ST2細胞当たりのOCIF結合蛋白質のサイト数は約33,000個/細胞であった。又、実施例5-(1)で記載したように、約40継代培養したST2細胞は破骨細胞形成支持能が10継代培養したST2細胞よりも高かったことから、前者のST2細胞上に発現した本発明蛋白質のサイト数を測定したところ、サイト数が58,000個/細胞であり、明らかに10継代培養したST2細胞よりも多く、本発明蛋白質の発現量の多寡がST2細胞による破骨細胞形成支持能の強弱に繋がっていることが明らかになった。このことは、本発明蛋白質は破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する因子であることを示す。

[実施例8]

OBMcDNAのクローニング

(1) マウスST2細胞からのRNAの抽出

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2(RIKEN CELL BANK, RCB0224)は、10%牛胎児血清を含む α -MEM培地(ギブコBRL社)を用いて培養した。付着細胞用25cm²T-フラスコでコンフルエントになるまで培養したST2細胞を、トリプシン処理してT-フラスコから剥がし洗浄した後、5枚の225cm²T-フラスコに移し、 10^{-8} M活性化ビタミンD₃(Calcitriol、和光純薬社)、 10^{-7} Mデキサメサゾン、

及び10% 牛胎児血清を添加した α -MEM培地を各々60mlづつ加えてCO₂ インキュベーター中で 5日間培養した。培養したST2細胞からISogen(和光純薬社)を用いて総RNAを抽出した。総 RNA約600 μ g からOligo(dT)-celluloseカラム(5'-3' Prime社)を用いてポリ A⁺ RNAを調製した。約 8 μ g のポリ A⁺ RNAを得た。

(2) 発現ライブラリーの構築

実施例8-(1)で得られたポリ A⁺ RNA 2 μ gからGreat Lengths cDNA Synthesis kit(Clontech社)を用い、その説明書に従い二本鎖cDNAを合成した。即ち、ポリ A⁺ RNA 2 μ g とOligo(dT)₂₅(dN) プライマーを混合し蒸留水を加え最終容量を6.25 μ l とし、70°Cで3分保温後、氷中で2分冷却した。この溶液に蒸留水 2.2 μ l、5X First-strand buffer 2.5 μ l、100mM DTT(ジチオスレイトール) 0.25 μ l、PRIME RNase Inhibitor(1U/ml)(5'-3' Prime社) 0.5 μ l、5倍希釈した[α -³²P]dCTP(アマシャム社、3000 Ci/mmol、2 μ Ci/ μ l) 0.5 μ l、dNTP(各20mM) 0.65 μ l、MMLV(RNaseH⁻) 逆転写酵素 1.25 μ l(250 ユニット)を加え、42°Cで90分保温した。さらに、蒸留水を 62.25 μ l、5X second-strand buffer 20 μ l、dNTP(各20mM) 0.75 μ l、Second-strand enzyme cocktail 5 μ lを添加し、16°Cで2 時間保温した。この反応液にT4DNA polymerase 7.5 ユニットを加え、16°Cでさらに30分保温後 0.2 M EDTA 5 μ l 添加して反応を停止し、フェノール・クロロフォルム処理後、エタノール沈殿を行った。この二本鎖cDNAの末端にEcoRI-SalI-NotI リンカー(Clontech社)を付加し末端をリン酸化した。サイズフラクション用カラムにより500bp 以上のcDNAを分離し、エタノール沈殿を行った。沈殿した DNAを水に溶解し、あらかじめ制限酵素 EcoRI(宝酒造社)切断及びCIAP(ウシ小腸アルカリ fosfataze、宝酒造社)処理して調製したpcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, Vol. 8, pp466-47

2, 1988) に挿入した。

(3) OCIFとの結合を指標とした発現ライブラリーのスクリーニング

実施例 8 -(2)で得られたDNAを用い大腸菌、XL2 Blue MRF' (東洋紡社) を形質転換し、1 ウェルあたり約100 コロニーとなるように細胞培養用24 ウェルプラスティックプレートに調製した。カーベニシリン寒天培地 (1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、60 μg/ml カーベニシリン、1.5%寒天) 上に増殖させた。各ウェル中の形質転換株を3ml のTerrific Brothアンピシリン培地(1.2% トリプトン、2.4%イーストエキス、0.4%グリセロール、0.017M KH₂PO₄、0.072M K₂HP0₄、100 μg/ml アンピシリン) に懸濁し、37°Cで一晩振盪培養した。遠心により集菌しQIAwell kit(QIAGEN社) を用いてプラスミド DNAを調製した。260nm における吸光度により DNA含量を測定し、エタノール沈殿により濃縮し、200ng/μl となるように蒸留水に溶解した。この様にしてそれぞれ約100 個のコロニーから由来する DNAプールを500 プール調製し、COS-7 細胞 (RIKEN CELL BANK, RCB0539)へのトランスフェクションに用いた。COS-7細胞を24 ウェルプレートに 8X10⁴ 細胞/ ウェルとなるように播種し、10% 牛胎児血清を含むDMEM培地を用いて、CO₂ インキュベーター中で37°Cにて一晩培養した。翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクトアミン (ギブコBRL 社) 添付のプロトコールに従い、予めOPTI-MEM培地 (ギブコBRL 社) を用いて希釀しておいた前記プラスミド DNAとリポフェクトアミン (ギブコBRL 社) を混合し、15分後この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いたDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ1 μg 及び4 μl とした。5 時間後、培地を除去し、1ml の10% 牛胎児血清を含むDMEM培地 (ギブコBRL 社) を添加し、CO₂ インキュベーター中 (5%CO₂)、37°Cで2-3 日培養した。上記の様にトランスフェクトし2-3 日培養したCOS-7 細胞を無血清DMEM培地で洗浄した後、 ¹²⁵I 標識したOC

IF 20ng/mlを加えた結合試験用培地（0.2%牛血清アルブミン、20mM Hepes緩衝液、0.1mg/ml heparin及び0.02% NaN₃を加えた無血清DMEM培地）200μlを各ウェルに加えた。CO₂ インキュベーター中（5%CO₂）で37°C 1時間培養した後、細胞を0.1mg/ml heparinを含むリン酸塩緩衝生理食塩水500 μlで2回洗浄した。洗浄後、0.1 N NaOH溶液 500μlを各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、各ウェル中の¹²⁵Iの量をガンマカウンター（パッカード社）で測定した。計500 プールをスクリーニングすることにより、OCIFと特異的に結合する蛋白質をコードするcDNAを含む DNAプール1つを分離した。さらに本発明のcDNAを含む DNAプールを細分化し、前記と同様のトランスフェクションとスクリーニング操作を繰り返すことにより、OCIFと結合する蛋白質をコードするcDNAを単離した。このcDNAを含むプラスミドをpOBM291と名付けた。このプラスミドを含む大腸菌は、pOBM291として通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5953として平成9年5月23日に寄託されている。OCIFの¹²⁵I標識ならびにELISAによる¹²⁵I標識OCIFの定量法を以下に示す。OCIFはヨードジェン(Iodogen)法により¹²⁵I標識した。2.5 mg/ml Iodogen－クロロホルム溶液20μlを1.5 mlエッペンドルフチューブに移し、40°Cでクロロホルムを蒸発させて、ヨードジェンコートしたチューブを調製した。このチューブを0.5 Mリン酸ナトリウム緩衝液(Na-Pi, pH 7.0)400μlで3回洗浄した後、0.5 M Na-Pi, pH 7.0, 5μlを加えた。このチューブにNa-¹²⁵I溶液(Amersham社、NEZ-033H20)1.3μl(18.5 MBq)を加えた後、直ちに1 mg/ml OCIF溶液(モノマー型あるいはダイマー型)10μlを加え、ボルテクスミキサーで攪拌した後、室温で30秒間放置した。この溶液を、予め10mg/ml沃化カリウム、0.5 M Na-Pi, pH 7.0溶液80μlと5%牛血清アルブミンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水(BSA-PBS)5μlを添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液をBSA-PBSで平衡化

しておいたスピンドラム (1ml, G-25 fine, ファルマシア社) に負荷し、2,000 rpm で 5 分間遠心した。カラムから溶出された画分に BSA-PBS を 400 μ l 加え攪拌した後、2 μ lを取り、その放射能をガンマーカウンターで測定した。このようにして調製した 125 I 標識OCIF溶液の放射化学純度は 10% TCAにより沈殿する画分の放射能を測定することにより求めた。また、 125 I 標識OCIF溶液のOCIF生物活性は、W096/26217号公報記載の方法に従い測定した。また、 125 I 標識OCIF濃度は、以下のようにELISAにより測定した。即ち、W096/26217号公報記載のウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を2 μ g/mlになるように溶解させた 50 mM NaHCO₃, pH 9.6 を100 μ l ずつ96ウェルイムノプレート(Nunc, MaxiSorpTM) の各ウェルに加えて4 °Cで一夜放置した。この液を吸い取った後、ブロックエース（雪印乳業）とリン酸塩緩衝生理食塩の混合水溶液（混合比25:75）(B-PBS) を 200 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 2 時間放置した。この液を吸い取った後、各ウェルを0.01% Polysorbate 80を含むリン酸塩緩衝生理食塩水 (P-PBS) で3 回洗浄し、次いで 125 I 標識OCIFサンプルあるいはOCIF標準品を添加した B-PBSを 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 2 時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS 200 μ l で各ウェルを 6 回洗浄した。パーオキシダーゼ標識したウサギ抗OCIFポリクローナル抗体をB-PBS で希釈した溶液を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 2 時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS 200 μ l で各ウェルを 6 回洗浄した。TMB 溶液 (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek 社) を100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で 2 -3分放置した後、停止液 (Stopping Reagent, Scytek社) を 100 μ l ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。OCIF標準品を用いて作製した検量線より 125 I 標識OCIFの濃度を求めた。

(4) OBMの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

実施例 8 -(3)で得られたOBMcDNAの塩基配列を、タックダイデオキシターミネーターサイクルシークエンシングキット(パーキンエルマー社)を用いて決定した。即ち、pOBM291 を鋳型とし、直接挿入断片の塩基配列を決定した。また、pOBM291 を制限酵素EcoRI で切断し得られた約1.0kb ならびに約0.7kb の断片をプラスミドpUC19(宝酒造社)のEcoRI 部位に挿入し、それらの断片の塩基配列も決定した。用いたプライマーは、pcDL-SR α 296 の挿入断片 DNAの塩基配列を決定するためのプライマーSRR2、プラスミドpUC19 の挿入断片 DNAの塩基配列を決定するためのプライマーM13PrimerM3、M13PrimerRV(ともに宝酒造社)及びOBMcDNAの塩基配列に基づいて設計された合成プライマーOBM#8 である。これらプライマーの配列を配列表配列番号3～6に示す。

また、決定されたOBMcDNAの塩基配列を配列番号2に、その配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号1にそれぞれ示す。

[実施例9]

本発明cDNAにコードされる蛋白質の発現

プラスミドpOBM291 を6ウェルプレートの各ウェル中でCOS-7細胞にリポフェクトアミンを用いトランスフェクションし、10%牛胎児血清を含むDMEM培地で2日間培養した。5%透析牛胎児血清を添加した、システイン・メチオニン不含DMEM(大日本製薬社)に培地交換し(800 μ l/well) 15分培養した後、Express Protein Labeling Mix (NEN 社、10mCi/ml) を14 μ l 添加した。4時間培養後、10%牛胎児血清を含むDMEM培地を200 μ l 加え1時間培養した。細胞をPBSで2回洗浄後、1% TritonX-100、1% bovine hemoglobin、10 μ g /ml leupeptin、0.2 TIU/ml aprotinin、1mM PMSFを含むTSA バッファー(0.14M NaCl、0.025% Na₃ を含む 10mM Tris-HCl(pH 8.0))を0.5 ml加え、氷上1時間静置した。ピペッティングにより細胞を破碎した後、4 °Cで3000X g 10分間遠心分離し上清を得

た。この上清100 μ l に 200 μ l の希釈バッファー (0.1 % TritonX-100、0.1% bovine hemoglobin、10 μ g/ml leupeptin、0.2 TIU/ml aprotinin、1mM PMSFを含むTSA バッファー) を加え、protein A Sepharose(50 μ l)とともに4 °Cで1 時間振とうさせた後、4 °Cで 1500X g にて1分間遠心分離し上清を回収することにより、protein A Sepharose に非特異的に吸着する分画を除いた。この上清に OCIF(1 μ g)を加え、4 °Cで1時間振とうさせながら OBMとOCIFを結合させた後、抗OCIFポリクローナル抗体 (50 μ g)を加えて4 °Cで1時間振とうした。これにprotein A Sepharose(10 μ l)を加えさらに4 °Cで1時間振とうした。4 °Cで1500 X g にて1分間遠心分離し沈澱画分を回収した。4 °C、1500 X gで1分間の遠心分離による沈澱の洗浄を、希釈バッファーで2回、bovine hemoglobin を含まない希釈バッファーで2回、TSA バッファーで1回、50mM Tris-HCl(pH 6.5) で1回行った。洗浄後、沈澱に10 % β メルカプトエタノールを含むSDS バッファー (0.125 M Tris-HCl、4 % ドデシル硫酸ナトリウム、20% グリセロール、0.002% プロモフェノールブルー、pH 6.8) を加え、100 °Cで5 分加熱後 SDS-PAGE(12.5% ポリアクリルアミドゲル、第一化学社)を行った。常法によりゲルを固定した後、Amplify(アマシャム社)により、アイソトープのシグナルを増強した後、Bio Max MRフィルム (KODAK 社) を用いて-80 °Cで感光させた。結果を第8図に示す。本発明cDNAにコードされる蛋白質の分子量は約40,000であることが示された。

[実施例10]

本発明cDNAにコードされる蛋白質とOCIFとの結合

プラスミドpOBM291 を24ウェルプレートの各ウェル中でCOS 細胞にリポフェクトアミンを用いてトランスフェクトし、その細胞を2-3 日培養したのち無血清DMEM培地で洗浄し、これに 125 I 標識したOCIF 20ng/mlを加えた結合試験用培地 (0.2%牛血清アルブミン、20mM Hepes緩衝液、0.1mg/ml heparin、0.2% NaN₃ を加

えた無血清DMEM培地) 200 μ l を加えた。また別のウェルには、 125 I 標識した OCIF 20ng/mlに加えて 8 μ g/mlの非標識OCIFを更に添加した結合試験用培地を200 μ l 加えて実験を行った。CO₂ インキュベーター中 (5% CO₂) で37°Cにて1 時間 培養した後、細胞を0.1mg/mlのheparin を含むリン酸緩衝生理食塩水500 μ l で 2回洗浄した。洗浄後、0.1 N NaOH溶液 500 μ l を各ウェルに加え、室温に10分 間放置することにより細胞を溶解させ、ウェル中の 125 I の量をガンマカウンターで測定した。その結果、第9図に示したようにプラスミドpOBM291 をトランスフェクトした細胞にのみ 125 I 標識したOCIFが結合することが確認された。また、その結合は、400 倍濃度のOCIFを添加することで著しく阻害されることが確 認された。以上の結果から、プラスミドpOBM291 上のcDNAにコードされる蛋白質、 OBM は、COS-7細胞表面でOCIFと特異的に結合することが明らかとなつた。

(実施例11)

125 I 標識したOCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンкиング 試験

本発明cDNAにコードされる蛋白質の性質をさらに詳しく解析するため、 125 I 標識したモノマー型OCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンкиングを行つた。実施例8-(3)に記載の方法に従つてプラスミドpOBM291 をCOS-7 細胞にトランスフェクトした後、上記の 125 I 標識したOCIF (25 ng/ml) を加えた 結合試験用培地 200 μ l を添加した。また、別のウェルには、 125 I 標識したOC IFに加え400 倍濃度の非標識OCIFをさらに添加した結合試験用培地を加えた。CO₂ インキュベーター中 (5% CO₂) で37°C 1時間培養した後、細胞を0.1mg/ml hepar inを含むリン酸塩緩衝生理食塩水500 μ l で2回洗浄した。この細胞に100 μ g/ mlのクロスリンкиング剤、DSS (Disuccinimidyl suberate, Pierce 社) を溶解させたリン酸塩緩衝生理食塩水 500 μ l を加え、0 °Cで 10 分間反応させた。こ

これらのウェルの細胞を0 °Cに冷却したリン酸緩衝生理食塩水 1 ml で2回洗った後、この細胞に1% Triton X-100(和光純薬社)、2mM PMSF (phenylmethysulfonyl fluoride、シグマ社)、10 μM pepstatin (和光純薬社)、10 μM leupeptin(和光純薬社)、10 μM antipain (和光純薬社)、及び 2 mM EDTA (和光純薬社) を含む 20 mM Hepes緩衝液 100 μl を加え、室温に30分間放置して細胞を溶解させた。これらのサンプル15 μl を常法により還元条件下で SDS化した後、SDS-電気泳動用ゲル (4-20% ポリアクリルアミドグラジエント、第一化学社) を用いて泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、BioMax MS フィルム(Kodak社) とBioMax MS 増感スクリーン (Kodak 社) を用いて-80 °Cで24時間感光させた。感光させたフィルムを常法により現像した。この結果、¹²⁵I 標識モノマー型OCIFと本発明cDNAによりコードされる蛋白質をクロスリンクさせることにより、第10図に示すように分子量約90,000-110,000のバンドが検出された。

(実施例12)

ノーザンプロットによる解析

付着細胞用25cm² T フラスコでコンフルエントになるまで培養したST 2 細胞を、トリプシン処理してT フラスコから剥がし洗浄した後、1 枚の225cm²T フラスコに播種し、10⁻⁸M 活性化ビタミンD₃、10⁻⁷M デキサメサゾン、及び10% 牛胎児血清を添加したα-MEM培地各々60mlを加えてCO₂ インキュベーター中で4 日間培養した。培養したST2細胞からISOGEN (和光純薬社) を用いて総 RNAを抽出した。また、活性化ビタミンD₃とデキサメサゾン非存在下で培養したST 2 細胞からも上記の方法で総RNAを抽出した。各総RNA 20 μg (4.5 μl)にそれぞれ 2.0 μl の 5X ゲル泳動緩衝液(0.2M モルホリノプロパンスルホン酸、pH 7.0、50mM 酢酸ナトリウム、5mM EDTA)、3.5 μl のホルムアルデヒド及び10.0 μl のホルムアミドを加え 55 °Cで15分保温後、電気泳動に供した。電気泳動用のゲ

ルは1.0%アガロース、2.2 M 脱イオン化ホルムアルデヒド、40 mM モルホリノプロパンスルホン酸 pH 7.0、10mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTAの組成で調製した。また、電気泳動は40 mM モルホリノプロパンスルホン酸、pH 7.0、10mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTAの緩衝液中で行った。電気泳動後、RNAをナイロンメンブレンにトランスファーした。pOBM291 を制限酵素EcoRI で切断して得られた、約1.0kb の DNA断片を、メガプライム DNAラベリングキット（アマシャム社）及び α -³²P-dCTP(アマシャム社)を用いて標識したものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、第11図に示すように、ST2細胞では活性化ビタミンD₃とデキサメサゾンの存在下で培養した場合に、本発明cDNAにコードされる蛋白質(OBM)の遺伝子発現が強く誘導されていることが明らかとなった。

〔実施例13〕

本発明cDNAにコードされる蛋白質の破骨細胞形成支持能

実施例8-(3)に記載の方法でCOS 細胞にpOBM291 をトランスフェクトした。3日後トリプシナイズした細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で一回遠心洗浄したのち、1% パラフォルムアルデヒドを含むPBS に細胞をサスペンドしながら室温で5分間固定し、PBS にて6回遠心洗浄した。 10^{-8} M 活性化ビタミンD₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、10% 牛胎児血清を含む α -MEM培地にて調製した 1×10^6 個/ml のマウス脾臓細胞及び 4×10^4 個/ml のST2 細胞を24ウェルプレートにそれぞれ 700 μ l、350 μ l 添加したのちTCインサート(Nunc社)を各ウェルにセットした。上記培地にて段階希釈した固定化COS 細胞(350 μ l)及びOCIF (50 μ l)をTCインサート中に添加して37°Cで6日間培養した。この結果、OCIFによる破骨細胞形成阻害活性が、本発明cDNAにコードされる蛋白質により抑制されることが明らかとなった。

〔実施例14〕

分泌型OBM の発現

(1) 分泌型OBM 発現プラスミドの構築

OBM HF（配列表配列番号7）とOBM XR（配列表配列番号8）をプライマー、pOBM291を鋳型としPCR反応を行った。この生成物を、アガロースゲル電気泳動で精製した後、制限酵素HindIII、EcoRIで切断し、さらにアガロースゲル電気泳動で精製した。この精製断片(0.6kb)を、pSec TagA(インビトローゲン社)のHindIII/EcoRV断片(5.2kb)と、OBM cDNAのEcoRI/PmaCI断片(0.32kb)とともにライゲーションキットver.2(宝酒造社)を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することによりpSec TagAに0.6Kbと0.32kbの断片が挿入されたプラスミドを選び出した。さらにこのプラスミドにつきダイターミネーターサイクルシークエンシングFSキット(パーキンーエルマー社)を用いてシークエンスを行い、このプラスミドが分泌型OBMをコードする配列(塩基配列：配列表配列番号2の338～1355番、アミノ酸配列：配列表配列番号1の72～316番)を持っていることを確認した。このプラスミドを制限酵素NheI、XhoIで切断した後、分泌型OBM cDNAに相当する断片(1.0kb)をアガロースゲル電気泳動で回収した。この断片をライゲーションキットを用いて発現ベクターpCEP4(インビトローゲン社)のNheI/XhoI断片(10.4kb)に挿入し、その反応生成物を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断して解析することにより、目的の構造を持った分泌型OBM発現プラスミド(pCEP sOBM)を持つ大腸菌株を選び出した。pCEP sOBMを持つ大腸菌株を培養し、キアフィルタープラスミドミディキット(キアゲン社)を用いてpCEP sOBMを精製した。

(2) 分泌型OBMの発現

293-EBNA細胞を10%FCS を含むIMDM (IMDM-10 %FCS)に懸濁し、コラーゲンコートした 24 ウェルプレート（住友ベークライト社）に 2×10^5 個/2ml/ ウェルになるように播種し、一晩培養した。この細胞に 1 μg のpCEP sOBM 又はpCEP4 をリポフェクトアミン（ギブコ社）4 μl を用いて形質導入し、0.5ml の無血清IMDM又はIMDM-10 %FCS 中でさらに 2 日間培養し、その培養上清を回収した。分泌型OBM の培養上清中での発現は、以下のようにして確認した。培養上清に最終濃度0.1Mになるよう炭酸水素ナトリウムを加えた後、培養液を96ウェルプレートに添加し、4 °Cで一晩放置し、培養上清中のOBM を96ウェルプレートに固相化した。このプレートをPBS で 4 倍希釈したブロックエース（雪印乳業社）溶液 (B-PBS)で室温に 2 時間放置しブロッキングした後、B-PBS で希釈した3-100ng/mlのOCIFを各ウェルに100 μl ずつ加え37°Cで 2 時間放置した。0.05% Tween 20 を含むPBS(PBS-T)でプレートを洗浄した後、B-PBS で希釈した W096/26217 号記載のパーオキシダーゼ標識ウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を各ウェルに100 μl ずつ添加し、37°Cで 2 時間放置した。PBS-T で各ウェルを 6 回洗浄した後、TMB 溶液 (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社) を100 μl ずつ各ウェルに加え、室温で約10分放置した後、停止液 (Stopping Reagent, Scytek社) を100 μl ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの 450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を第12図に示す。pCEP sOBM を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、添加したOCIFの濃度に依存して450nm の吸収が増加したが、ベクターpCEP4 を形質導入した細胞の培養上清を固定化した場合は吸収の増加はみられなかった。又、固定化に用いる培養上清の割合を5-90% の範囲で種々に変化させ、一定濃度のOCIF (50ng/ml)を添加した際の実験の結果を第13図に示す。pCEP sOBM を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、培養上清の割合が高くなるほど450nm の吸収が増加したが、ベクターpC

EP4 を形質導入した細胞の培養上清を固定化したプレートでは、吸収の増加は見られなかった。以上の結果より、分泌型OBM が、pCEP.sOBM を形質導入した細胞の培養上清中に生産されていることが確認された。

(実施例15)

チオレドキシン-OBM 融合蛋白質 (Trx-OBM)の発現

(1) チオレドキシン-OBM融合蛋白質 (Trx-OBM)発現ベクターの構築

10 μ l の10X ExTaq バッファー（宝酒造社）、8 μ l の10mMdNTP（宝酒造社）、77.5 μ l の滅菌蒸留水、2 μ l のpOBM291 水溶液(10ng/ μ l)、1 μ l のプライマー-OBM3 (100pmol/ μ l、配列表配列番号 9)、1 μ l のプライマー-OBMSalR2 (10 0pmol/ μ l、配列表配列番号 10)、0.5 μ l のExTaq (5u/ μ l)（宝酒造社）を混合しマイクロ遠心管中でPCR 反応を行った。95°C 5 分、50°C 1 秒、55°C 1 分、74°C 1秒、72°C 5分の反応後、96°C 1分、50°C 1秒、55°C 1分、74°C 1秒、72°C 3分の反応を25サイクル行った。1 %アガロースゲル電気泳動により、反応液全量から約750bp のDNA 断片をQIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNA 断片全量を制限酵素SalI, EcoRI（宝酒造社）で切断した後、1.5 %アガロースゲル電気泳動を行い約160bp のDNA 断片（断片1）を精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。同様に、4 μ g のpOBM291 を制限酵素BamHI, EcoRI(宝酒造社) で切断し得られた約580bp のDNA 断片（断片2）、及び2 μ g のpTrXFus (InVitrogen社) を制限酵素BamHI, SalI（宝酒造社）で切断し得られた約 3.6kbのDNA 断片（断片3）をそれぞれ精製し、それぞれを20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。DNA 断片の精製にはQIAEX II gel extraction kit を用いた。断片1、断片2、断片3を DNAligation kit ver.2（宝酒造社）を用い、16°Cで 2 時間30分保温することにより結合させた。ライゲーション反応液を用い大腸菌 GI724 株（インビトローゲン社）をThioFusion Expression System（インビトロ

ーゲン社)添付のInstruction Manualに記載の方法で形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株の中から、制限酵素切断により得られるDNA断片地図の解析並びにDNA配列の決定により、OBMcDNA断片(塩基配列:配列表配列番号2の350~1111、アミノ酸配列:配列表配列番号1の76~316)がチオレドキシン遺伝子に同じ読み枠で結合しているプラスミドを持つ菌株を選び出した。得られた菌株をGI724/pTrxOBM25と名付けた。

(2) 大腸菌でのOBMの発現

GI724/pTrxOBM25株及びpTrxFusを持つGI724株(GI724/pTrxFus)それぞれを2mlのRMG-Amp培地(0.6%Na₂HP0₄、0.3%KH₂PO₄、0.05%NaCl、0.1%NH₄Cl、1.2%カザミノ酸(Difco社)、1%グリセロール、1mM MgCl₂、100μg/mlアンピシリン(Sigma社)pH7.4)で30°Cで6時間振とう培養した。菌液0.5mlを50mlのInduction培地(0.6%Na₂HP0₄、0.3%KH₂PO₄、0.05%NaCl、0.1%NH₄Cl、0.2%カザミノ酸、0.5%グルコース、1mM MgCl₂、100μg/mlアンピシリン、pH7.4)に添加し、30°Cで振とう培養した。OD_{600nm}での値が約0.5になった時点で最終濃度が0.1mg/mlになるようにL-トリプトファンを添加し、さらに30°Cでの振とう培養を6時間継続した。菌液を3000×gで遠心し菌体を集め、12.5mlのPBS(10mMリン酸バッファー、0.15M NaCl、pH7.4)に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置(Ultrasonics社)にかけ菌体を破碎し、7000×gで30分遠心して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。この可溶性蛋白質画分液10μlずつを還元条件下でのSDSポリアクリルアミド(10%)電気泳動に供した。この結果、GI724/pTrxOBM25の可溶性蛋白質画分液にはGI724/pTrxFusの可溶性蛋白質画分液には見られない分子量約40kDaのバンドが検出された(第14図)。よって、チオレドキシンとOBMの融合蛋白質(Trx-OBM)が大腸菌中で発現していることが確認された。

(3)Trx-OBMのOCIFとの結合能

発現させたTrx-OBM がOCIFと結合することを以下の実験により確認した。即ち、96ウェルイムノプレート（Nunc社）の各ウェルに10mM炭酸水素ナトリウム水溶液で5000倍に希釈した抗チオレドキシン抗体（インビトローゲン社）を $100\mu\text{l}$ ずつ添加し 4°C で一晩放置した。各ウェル中の液を捨てた後、ブロックエース（雪印乳業社）をPBSで2倍希釈した溶液（BA-PBS）を各ウェルに $200\mu\text{l}$ ずつ添加し室温で1時間放置した。液を捨てた後、各ウェルにBA-PBSで段階希釈した上記 GI724/pTrxOBM25 由来及びGI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分液を $100\mu\text{l}$ ずつ添加し室温で2時間放置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、BA-PBSで希釈したOCIF（100ng/ml）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ添加し室温で2時間放置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、BA-PBSで2000倍希釈した W096/26217 号記載のパーオキシダーゼ標識ウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、2時間室温で放置した。PBS-Tで各ウェルを6回洗浄した後、TMB 溶液（TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社）を $100\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で約10分放置した後、停止液（Stopping Reagent, Scytek社）を $100\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を第15図に示す。GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分液を添加したものでは添加しなかったものと比べて吸光度には認められなかったが、GI724/pTrxOBM25 由来可溶性蛋白質画分液を添加したものでは、その添加濃度の増加に依存して吸光度が上昇した。又、添加する可溶性蛋白質画分液の希釈割合を一定（1%）にし、BA-PBSで段階希釈したOCIF（0-100ng/ml）を添加した場合の実験結果を第16図に示す。GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分液を用いたものではOCIF濃度に係わりなく吸光度は低いままであったが、GI724/pTrxOBM25 由来可溶性蛋白質画分液を用いたものでは添加したOCIF濃度に依

存して吸光度が上昇した。この結果より、 GI724/pTrx0BM25 で生産されるTrx-0BM は、OCIFと結合する能力があることが確認された。

(4) Trx-0BMを生産する大腸菌の大量培養

GI724/pTrx0BM25 をRMG-Amp 寒天培地 (0.6 %Na₂HPO₄、 0.3 %KH₂PO₄、 0.05 %NaCl、 0.1 %NH₄Cl 、 2 %カザミノ酸、 1 %グリセロール、 1 mM MgCl₂、 100 μg/mlアンピシリン、 1.5%寒天、 pH7.4) に白金耳で塗まつし、 30°Cで一晩培養した。菌を10mlのInduction 培地に懸濁し、 5mlずつを500ml のInduction 培地のはいった2 L用三角フラスコ計2本に添加し、 30°Cで振とう培養した。OD_{600 nm} での値が約0.5 になった時点で最終濃度が0.1mg/mlになるようにL-トリプトファンを添加し、 さらに30°Cで振とう培養を6時間継続した。菌液を3000×g で20分間遠心分離して菌体を集め、 菌体を160ml のPBS に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置 (Ultrasonics 社) にかけ菌体を破碎し、 7000×g で30分間遠心して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。

(5) OCIF固定化アフィニティーカラムの調製

TSKgel AF-トレシルトヨパール650(東ソー社) 2g とW096/26217号に記載の方法で調製した遺伝子組み換え型OCIF 35.0 mgを含む 1.0 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 40mlとを混合し4 °Cで一晩ゆっくり振とうしカップリング反応を行った。過剰な活性基を不活性化する為、 遠心分離により上清を除去した後、 40mlの0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を沈殿した担体に加え、 室温で1 時間おだやかに振とうした。0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.3) 及び0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0) を通液しカラムを洗浄した後、 0.01% Polysorbate 80 を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で 2度洗浄し、 平衡化した。

(6) OCIF固定化アフィニティーカラムによるTrx-OBMの精製

Trx-OBM の精製は、特に断らない限り4 °Cで行った。上記のOCIF固定化アフィニティー担体（10ml）と上記実施例15-(4)記載の可溶性蛋白質画分液（120ml）とを混合後、50ml遠心管（4本）中で、ローターを用いて4 °Cで一晩おだやかに振とうした。この混合液中の担体をエコノカラム（バイオラッド社、内径1.5cm 長さ15cm）に充填した。0.01% Polysorbate 80 を含むPBS 300ml、0.01% Polysorbate 80 と 2M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）100ml、及び0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M グリシン-塩酸緩衝液（pH 3.3）100ml を順次通液してカラムを洗浄した。次に、0.01% Polysorbate 80 と0.2M NaCl を含む0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.0）を通液し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は5 mlずつ分取した。分取した画分には、10%容量の2Mトリス溶液（pH 8.0）を加え、直ちに中和した。溶出液各画分中のTrx-OBMの有無を上記実施例15-(3)記載の方法（OCIFとの結合能）により調べた。Trx-OBMを含む画分を集めさらに精製した。

(7) ゲルfiltrationによるTrx-OBMの精製

上記実施例15-(6)のTrx-OBMフラクション約25mlを、Centriplus 10 及び Centricon 10 (amicon社) を用いて、約 0.5 ml に遠心濃縮した。このサンプルを、予め 0.01 %Polysorbate 80を含む PBSで平衡化した Superose 12 HR 10/30 カラム（1.0 x 30 cm、ファルマシア社）にかけた。分離には、0.01% Polysorbate 80を含む PBSを移動相として用い、流速 0.25 ml/minで展開した。カラムからの溶出液は 0.25 mlずつ分取した。分取した画分のTrx-OBMは、実施例15-(3)記載の方法及びPhast System (ファルマシア社) を用いた SDS- ポリアクリルアミド電気泳動(10-15%ポリアクリルアミドゲル、ファルマシア社) と銀染色で検出した。純化されたTrx-OBMを含むフラクション (Fr. 20-23) を集め、Trx-OBM

の蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度の測定は、ウシ血清アルブミンを標準品として用い DC-protein assay kit (バイオラッド社) で行った。

〔実施例16〕

OBM の破骨細胞形成誘導活性

pOBM291 及びpcDL-SR α 296 をリポフェクトアミン (ギブコ社) を用いてCOS-7細胞にそれぞれトランスフェクトした。それぞれの細胞を10%FCS を含む DMEMで1日培養後トリプシン処理し、カバーガラス(15mm 丸形、マツナミ社) を敷いた24ウェルプレートに1 ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を播種し、さらに2日間培養した。培養プレートをPBS で1回洗浄したのち、1 %パラフォルムアルデヒドを含むPBS を加えて室温で8 分間インキュベートし細胞を固定した。細胞を固定したプレートをPBS にて6回洗浄したのち、 10^{-8} M 活性型ビタミンD₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、10%牛胎児血清を含む α -MEMにて 1×10^6 個/ml に懸濁したマウス脾臓細胞を1 ウェルあたり700 μ l 添加した。各ウェル上に Millicell PCF (ミリポア社) をセットし、上記培地にて 4×10^4 個/ml に懸濁したST2 細胞をMillicell PCF 中に 700 μ l 添加し37°C、6 日間培養した。培養終了後、Millicell PCF を取り除き、プレートをPBS で1回洗浄後、アセトン-エタノール溶液 (50:50)で1 分間細胞を固定した後、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASEキット (シグマ社) を用いて破骨細胞特異的マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (TRAP活性) を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、pcDL-SR α 296 をトランスフェクトしたCOS-7細胞を固定したウェル中にはTRAP活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、pOBM291 をトランスフェクトした細胞を固定したウェル中には 45 ± 18 個 (平均土標準偏差、n=3)のTRAP陽性細胞が観察された。又、これらのTRAP陽性細胞に、カルシトニンが結合することも確認された。これより、OBM には破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

〔実施例17〕

Trx-OBM及び分泌型OBM による破骨細胞形成誘導活性

マウス脾臓細胞を 10^{-8} M 活性型ビタミンD₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、10%牛胎児血清を含む α -MEMに 2×10^6 個/ml になるように懸濁し、この懸濁液を24ウェルプレートに1 ウェルあたり $350 \mu\text{l}$ 添加した。精製したTrx-OBMを上記培地で希釈した溶液 (40ng/ml)、pCEP sOBM 又はpCEP4 を形質導入した293-EBNA細胞をIM DM-10 %FCS で培養した培養上清を上記培地にて10倍希釈した溶液、又は上記培地のみをそれぞれ $350 \mu\text{l}$ 上記のウェルに添加した後、Millipore PCF(ミリポア社)を各ウェルにセットし、上記培地にて懸濁した 4×10^4 個/ml のST2 細胞をMillipore PCF に $600 \mu\text{l}$ 添加した。6 日間培養した後、Millipore PCF を取り除き、プレートをPBS で一回洗浄後、アセトン-エタノール溶液 (50:50)で1 分間細胞を固定したのち、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASEキット (シグマ社) を用いて酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (TRAP活性) を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、Trx-OBMを添加しなかったウェル中にはTRAP活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、Trx-OBMを添加したウェルには 106 ± 21 個 (平均士標準偏差、n=3)のTRAP陽性細胞が観察された。同様にpCEP4 で形質導入された293-EBNAの培養上清を添加したウェル中にはTRAP活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、pCEP sOBM で形質導入された293-EBNAの培養上清を添加したウェルには 120 ± 31 個 (平均士標準偏差、n=3)のTRAP陽性細胞が観察された。又、これらのTRAP陽性細胞に、カルシトニンが結合することも確認された。これより、Trx-OBM 及び分泌型OBM には、破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

〔実施例18〕

本発明のcDNAにより発現される蛋白質OBM と本発明の天然型のOCIF結合蛋白質

との同一性(1) ウサギ抗OBM ポリクローナル抗体の作製

雄性日本白色ウサギ（体重2.5 - 3.0 kg、北山ラベス社より入手）3羽に、実施例14-(6)及び(7)記載の方法により得られた精製OBM(チオレドキシン-OBM融合蛋白質) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をフロイント完全アジュvant (DIFCO 社)と等量混合してエマルジョンとしたものを、1回1 mlずつ皮下免疫した。免疫は1週間間隔で合計6回行い、最終免疫後10日目に全採血を行った。分離した血清から抗体を以下の様に精製した。即ち、PBSで2倍希釈した抗血清に最終濃度が40% (w/v %)となるように硫酸アンモニウムを添加して4°Cで1時間放置後、8000 x gで20分間遠心分離を行い、沈殿を得た。沈殿を少量のPBSに溶解し、PBSに対して4°Cで透析した後、Protein G-Sepharoseカラム（ファルマシア社製）に負荷した。PBSで洗浄後、0.1 M グリシン- 塩酸緩衝液 (pH 3.0) で吸着した免疫グロブリンGを溶出し、直ちに1.5Mトリス- 塩酸緩衝液 (pH 8.7) で中性pHとした。溶出蛋白質画分をPBSに対して透析後、280 nmにおける吸光度を測定し、その濃度を決定した ($E^{1\%} 13.5$)。西洋ワサビパーオキシダーゼ標識した抗 OBM抗体は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピアス社）を用いて作製した。即ち、1 mgの精製抗体に80 μg のN-スクシンイミド-S-アセチルチオ酢酸を添加し、室温で30分間反応させた。これに5 mgのヒドロキシルアミンを添加して脱アセチル化した後、修飾された抗体をポリアクリラミド脱塩カラムにて分画した。蛋白質画分を1 mgのマレイミド活性化パーオキシダーゼと混合し、室温で1時間反応させ酵素標識抗体を得た。

(2) ウサギ抗OBM ポリクローナル抗体による本発明のcDNAにより発現される蛋白質 (OBM)あるいは本発明の天然型の蛋白質とOCIFとの特異的結合能の阻害

実施例15-(6)及び(7)記載の方法で得られた精製 OBM (チオレドキシン- OBM

融合蛋白質) 及び実施例 2 -(4)の天然型精製OCIF結合蛋白質をそれぞれ0.1 M 炭酸水素ナトリウムに2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解し、それぞれの溶液100 μl ずつを96ウェルイムノプレート(Nunc 社製) の各ウェルに加え、4 °Cで一夜放置した。各ウェルに50% 濃度のブロックエースを200 μl ずつ加え、室温で1時間放置した。各ウェルを0.1 %ポリソルベート20を含むPBS(P20-PBS)で3回洗浄した後、P20-PBS で希釈した25% 濃度のブロックエースにウサギ抗 OBM抗体を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解し、その抗体溶液あるいは抗体を含まない25% 濃度のブロッケース溶液を100 μl ずつ各ウェルに添加し、37°C、1時間インキュベートした。各ウェルを P20-PBSで3回洗浄した後、実施例 8 -(3)記載の ^{125}I 標識したOCIF20 ng/mlを加えた結合試験溶液 (0.2 %牛血清アルブミン、20 mM Hepes、0.1 mg/ml ヘパリンを加えたP20-PBS)を 100 μl ずつ各ウェルに添加した。又、別のウェルには、 ^{125}I 標識したOCIF 20ng/mlに加えて 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の非標識OCIFを含む結合試験溶液を100 μl 加えて実験を行った。そのイムノプレートを37°C、1時間インキュベートした後、各ウェルをP20-PBS で6回洗浄した。各ウェル中の ^{125}I の量をガンマカウンターで測定した。結果を第17図に示す。図に示したように、本発明cDNAにより発現され、精製して得られるOBM 及び本発明の天然型のOCIFに特異的に結合する蛋白質は、ウサギ抗 OBMポリクローナル抗体で処理することによって、 ^{125}I 標識したOCIFとの結合は全く起こらなかった。一方、抗体処理しなかった両蛋白質には、 ^{125}I 標識OCIFが結合することが確認された。又、それらの結合は 400倍濃度の非標識OCIF(8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加することにより顕著に阻害されることから、両蛋白質のOCIFへの結合は特異的結合であることが明らかになった。以上の結果から、ウサギ抗 OBMポリクローナル抗体は、本発明cDNAにより発現される蛋白質である OBM及び本発明の天然型のOCIF結合蛋白質を共に認識し、両蛋白質とOCIFとの特異的結合を阻害することが明らかになった。

(実施例19)

ヒトOBMcDNAのクローニング(1) マウスOBM プライマーの調製

ヒトOBMcDNAのスクリーニングには、上記の実施例の方法に従い調製したマウス OBMプライマー、OBM#3 及びOBM#8 を用いた。それぞれの配列を配列表配列番号 9 及び 6 に示す。

(2) PCR によるヒトOBMcDNA断片の取得

ヒトリンパ節由来cDNAライブラリーとしてHuman Lymph Node Marathon ready cDNA (クロンテック社) を鋳型として、上記(1) で調製したマウスOBMcDNA プライマーを用いて、PCR を行いヒトOBMcDNA 断片を取得した。

以下に用いたPCR の条件を示す。

10× EX Taq バッファー (宝酒造社)	2 μl
2.5 mM dNTP	1.6 μl
cDNA溶液	1 μl
EX Taq (宝酒造社)	0.2 μl
蒸留水	14.8 μl
40 μM プライマーOBM#3	0.2 μl
40 μM プライマーOBM#8	0.2 μl

上記溶液をマイクロフュージチューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95°Cで 2 分間前処理し、95°C30秒、57°C30秒及び72°C 2 分30秒間の 3 段階の反応を40回繰り返した後、72°Cで 5 分間保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動に供したところ、上記マウスOBMcDNA プライマーで増幅される約 690bpの DNA 断片が検出された。

(3) PCR により増幅されたヒトOBMcDNA 断片の精製と塩基配列の決定

実施例19-(2)で得られたヒトOBMcDNA断片をアガロース電気泳動により分離し、さらにQIAEXゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。この精製されたヒトOBMcDNA断片を鋳型として、再度上記マウスOBMcDNAプライマーを用いてPCRを行い、このヒトOBMcDNA断片を大量に調製し、同様にQIAEXゲルエクストラクションキットにより精製した。精製されたヒトOBMcDNA断片の塩基配列を、OBM#3及びOBM#8（配列表9及び6）をプライマーとして、タックダイテオキシターミネーターサイクルシークエンシングFSキット(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit;パーキンエルマー社)を用いて決定した。このヒトOBMcDNA断片の塩基配列は、マウスOBMcDNAの相当する領域と比較した結果、80.7%の相同性を示した。

(4) 約690 bpのヒトOBMcDNA断片をプローブとしたハイブリダイゼーション法による全長ヒトOBMcDNAのスクリーニング

実施例19-(3)で精製された約690 bpのヒトOBMcDNA断片をメガプライムDNAラベリングキット（アマシャム社）を用いて [α^{32} P] dCTPで標識し、全長のヒトOBMcDNAをスクリーニングした。スクリーニングの対象としては、Human Lymph Node 5'-STRETCH PLUS cDNAライブラリー（クロントック社、USA）を用いた。同社のプロトコールに従い、組み換えファージを37°Cで15分間大腸菌C600 Hfrに感染させた後、その大腸菌を45°Cに加温したLB寒天培地（1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、0.7%寒天）に添加し、1.5%寒天を含むLB寒天培地プレート上に流し込んだ。37°Cで一夜培養後、プラークの生じたプレート上にハイボンドN（アマシャム社）を約3分間密着させた。このフィルターを常法に従いアルカリ変性処理した後、中和し、2×SSC溶液に浸した後、UVクロスリンク（ストラタジーン社）によりDNAをフィルターに固定した。得られたフィルターをRapid-hybバッファー（アマシャム社）に浸漬し、65°Cで15分間前処理し

た後、熱変性した上記ヒトOBMcDNA 断片（約690 bp、 5×10^5 cpm/ml）を添加した上記バッファーに移し替え、65°Cで一夜ハイブリダイゼーションさせた。反応後、フィルターをそれぞれ0.1 % SDSを含む2 × SSC、1 × SSC及び0.1 × SSCで順次1回ずつ 65 °Cで15分間洗浄した。得られたいくつかの陽性クローンをさらに2回スクリーニングを繰り返すことにより純化した。それらの中から、約2.2 kbのインサートを持つクローンを選択し、以下の実験に用いた。この純化したファージを入hOBMと名付けた。純化した入hOBMからQIAGEN Lambda キット（キアゲン社）のプロトコールに従い、約10 μg のDNAを得た。このDNAを制限酵素Sall Iで消化した後、アガロース電気泳動により約2.2 kbのhOBMインサートcDNAを分離した。QIAEX ゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製したこのDNA断片を、あらかじめ制限酵素Sall Iで切断し、脱リン酸化しておいたプラスミドpUC19 (MBI社) にDNAライゲーションキット ver.2 (宝酒造社) を用いて挿入した。得られたDNA断片を含むpUC19で大腸菌DH 5α (ギブコBRL 社) を形質転換させた。得られた形質転換株はpUC19hOBM と名付け、これを増殖させ、約2.2 kbのヒトOBMcDNAが挿入されたプラスミドを常法により精製した。

(5) ヒトOBM の全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

実施例19-(4)で得られたヒトOBMcDNA の塩基配列を、タックダイデオキシタミネーターサイクルシークエンシングFSキット（パーキンエルマー社）を用いて決定した。即ち、pUC19hOBM を鋳型とし、挿入断片の塩基配列を決定した。プライマーとして、pUC19 の挿入断片 DNAの塩基配列を決定するためのプライマー、M13PrimerM3 及びM13 PrimerRV (ともに宝酒造社) 、及びヒトOBMcDNA 断片（約690bp）の塩基配列に基づいて設計した合成プライマーヒト OBM#8を用いた。用いたプライマー、M13PrimerM3 及びM13PrimerRV の配列を、それぞれ配列表配列番号4及び5に示す。これにより決定された、ヒトOBMcDNA の塩基配列から推定さ

れるヒトOBM のアミノ酸配列を配列表配列番号11、又、ヒトOBMcDNA の塩基配列を配列表配列番号12に、それぞれ示す。

得られたヒトOBMcDNA を含むプラスミド、pUC19hOBM で形質転換した大腸菌は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-6058 として平成9年8月13日に寄託されている。

〔実施例20〕

OCIFの¹²⁵I標識ならびにELISAによる¹²⁵I標識OCIFの定量

OCIFはヨードジエン(Iodogen) 法により¹²⁵I標識した。2.5 mg/ml Iodogen-クロロホルム溶液20 μl を1.5 mlエッペンドルフチューブに移し、40°Cでクロロホルムを蒸発させて、ヨードジエンコートしたチューブを調製した。このチューブを0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液(Na-Pi, pH 7.0) 400 μl で3回洗浄した後、5 μl の0.5 M Na-Pi, pH 7.0 を加えた。このチューブにNa-¹²⁵I 溶液(アマシヤム社、NEZ-033H) 1.3 μl (18.5 MBq)を加えた後、直ちに1 mg/ml OCIF溶液(モノマー型あるいはダイマー型) 10 μl を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温で30秒間放置した。この溶液を、予め10 mg/ml 沃化カリウムを含む0.5 M Na-Pi (pH 7.0) 溶液80 μl と5%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(BSA-PBS) 5 μl を添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液をBSA-PBS で平衡化したスピンカラム(1 ml, G-25 Sephadex fine, ファルマシア社)に負荷し、2,000 rpm で5分間遠心した。カラムから溶出された画分に BSA-PBS を400 μl 加え攪拌した後、2 μlを取り、その放射能をガンマーカウンターで測定した。このようにして調製した¹²⁵I標識OCIF溶液の放射化学純度は10%トリクロロ酢酸(TCA) により沈殿する画分の放射能を測定することにより求めた。

¹²⁵I標識OCIFのOCIF生物活性は、W096/26217号記載の方法に従い測定した。又、¹²⁵I標識OCIF濃度は、以下のようにELISA により測定した。即ち、W096/26217号

公報記載のウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を2 μg/mlになるように溶解した50 mM NaHCO₃, pH 9.6を100 μl ずつ96ウェルイムノプレート(Nunc 社、MaxiSorp™) の各ウェルに加えて、4 °C一夜放置した。この溶液を捨てた後、ブロックエース（雪印乳業社）とリン酸塩緩衝生理食塩水との混合水溶液（混合比 25:75）(B-PBS) を200 μl ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を捨てた後、各ウェルを0.01% Polysorbate 80 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(P-PBS) で3回洗浄し、次いで¹²⁵I標識OCIFサンプルあるいはOCIF標準品を添加したB-PBSを100 μl ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を捨てた後、P-PBS 200 μl で各ウェルを6回洗浄した。パーオキシダーゼ標識したウサギ抗OCIFポリクローナル抗体をB-PBSで希釈した溶液を100 μl ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この溶液を捨てた後、P-PBS 200 μl で各ウェルを6回洗浄した。TMB 溶液(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社) を100 μl ずつ各ウェルに加え、室温で2～3分間放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek社) を100 μl ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。OCIF標準品を用いて作成した検量線より¹²⁵I標識OCIFの濃度を求めた。

〔実施例21〕

本発明cDNAにコードされる蛋白質の発現

(1) 動物細胞用hOBM発現ベクターの構築

pUCHOBM を制限酵素SalIで切断し、約2.2 kbの DNA断片を1%アガロース電気泳動により精製し、DNA ブランディングキット（宝酒造社）により末端を平滑化した（平滑化 hOBMcDNA 断片）。発現プラスミド pcDL-SRα296 (Molecular and Cellar Biology, Vol 8, pp466-472 (1988)) を制限酵素EcoRI で切断し、ブランディングキットにより末端を平滑化したものと、平滑化したhOBMcDNA 断片と

をDNA ライゲーションキットver.2 により結合させた。ライゲーション反応液を用い大腸菌DH α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株から、制限酵素切断により得られる DNA断片地図の解析並びに DNA配列の決定により、SR α プロモーターによる転写方向に対して hOBMcDNA の転写方向が順向きに挿入されているプラスミド、phOBM を持つ菌株を選びだし、DH5 α /phOBMと名付けた。

(2) COS-7細胞でのヒトOBM の発現

大腸菌、DH5 α /phOBMを培養し、キアフィルタープラスミドミディキット（キアゲン社）を用い、プラスミドphOBMを精製した。phOBMを6 ウェルプレートの各ウェル中でCOS-7 細胞にリポフェクトアミンを用いてトランスフェクションし、10%牛胎児血清を含むDMEM中で2 日間培養した。5 %透析牛胎児血清を添加した、システイン・メチオニン不含DMEM（大日本製薬社）に培地交換し (88 μ l/well) 15分間培養した後、Express Protein Labeling Mix (NEN 社、10 mCi/ml)を14 μ l 添加した。4 時間培養後、10%牛胎児血清を含むDMEMを200 μ l 加え 1 時間培養した。細胞をPBS で2回洗浄後、1 % Triton X-100 、1 %牛ヘモグロビン、10 μ g/mlロイペプチジン(leupeptin) 、0.2 TIU/mlアプロチニン(aprotinin) 及び 1 mM PMSF を含むTSA バッファー(0.14M NaCl 、0.025 % NaN₃ を含む10mMトリス - 塩酸、pH 8.0) を0.5 ml加え、氷上で1 時間静置した。ピペッティングにより細胞を破碎した後、4 °C、3,000×g、10分間遠心し上清を得た。この上清100 μ l に200 μ l の希釈バッファー(0.1% Triton X-100 、0.1 %牛ヘモグロビン、10 μ g/mlロイペプチジン、0.2 TIU/mlアプロチニン及び 1 mM PMSF を含むTSA バッファー) を加え、Protein A Sepharose (50 μ l)とともに4 °Cで1 時間振盪させた後、4 °C、1,500 × g で1 分間遠心分離し上清を回収することにより：Protein A Sepharose に非特異的に吸着する蛋白質を除去した。この上清にOCIF (1 μ g) を加え、4 °Cで1 時間振盪させながらヒトOBM とOCIFを結合させた後、ウサギ抗

OCIFポリクローナル抗体 ($50 \mu\text{g}$)を加えて 4°C で1時間振盪した。この溶液に Protein A Sepharose ($10 \mu\text{l}$)を加え、更に 4°C で1時間振盪した。 4°C 、 $1,500 \times g$ で1分間遠心分離し沈殿画分を回収した。 4°C 、 $1,500 \times g$ で1分間遠心分離して得られた沈殿を希釈バッファーで2回、牛ヘモグロビンを含まない希釈バッファーで2回、TSA バッファーで1回、 50 mM トリス- 塩酸 (pH 6.5) で1回、それぞれ洗浄後、沈殿に 10% β メルカプトエタノールを含むSDS バッファー(0.125M トリス- 塩酸、 4% ドデシル硫酸ナトリウム、 20% グリセロール、 0.002% プロモフェノールブルー、pH 6.8) を加え、 100°C で5分間加熱後、SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミドゲル、第一化学社) にかけた。常法によりゲルを固定、乾燥させ、Amplify(アマシャム社) により、アイソトープのシグナルを増強した後、Bio Max MRフィルム (コダック社) を用いて -80°C で感光させた。結果を第18図に示す。この結果、本発明のcDNAにコードされる蛋白質の分子量は、約40,000であることが明らかとなった。

(実施例22)

本発明cDNAにコードされる蛋白質とOCIFとの結合

実施例21-(2)と同様に精製されたphOBM を24ウェルプレートの各ウェル中でCO S-7 細胞にリポフェクトアミンを用いてトランスフェクトし、その細胞を2~3日間培養した後、無血清DMEMで洗浄し、これに ^{125}I 標識したOCIF 20 ng/ml を加えた結合試験培地 (0.2% 牛血清アルブミン、 20mM Hepes緩衝液、 0.1mg/ml ヘパリン、 0.2% NaN_3 を加えた無血清DMEM) $200 \mu\text{l}$ を加えた。また別のウェルには、 ^{125}I 標識したOCIF 20 ng/ml に加えて更に $8 \mu\text{g/ml}$ の非標識OCIFを添加した結合試験培地を $200 \mu\text{l}$ 加えて実験を行った。 CO_2 インキュベーター中 ($5\% \text{ CO}_2$)、 37°C で1時間培養した後、細胞を 0.1mg/ml のヘパリンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水 $500 \mu\text{l}$ で2回洗浄した。洗浄後、 0.1N NaOH 溶液 $500 \mu\text{l}$ を各ウェルに加

え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、ウェル中の¹²⁵Iの量をガンマカウンターで測定した。この結果、第19図に示したように、phOBMをトランスフェクトした細胞にのみ¹²⁵I標識したOCIFが結合することが確認された。又、その結合は400 倍濃度の非標識 OCIF (8 μg/ml) を添加することにより、顕著に阻害されることが確認された。以上の結果から、phOBM 上のcDNAにコードされる蛋白質ヒトOBM は、COS-7 細胞表面でOCIFに特異的に結合することが明らかとなった。

[実施例23]

¹²⁵I標識したOCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンキング試験

本発明cDNAにコードされる蛋白質の性質を更に詳しく解析するため、¹²⁵I標識したモノマー型OCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンキングを行った。即ち、実施例21-(1)及び(2) に記載した方法に従って、それぞれ発現ベクターをphOBM を構築し、COS-7 細胞にトランスフェクトした後、上記の¹²⁵I標識したOCIF (25 ng/ml) を加えた結合試験用培地を200 μl ずつ各ウェルに添加した。又、別のウェルには、¹²⁵I標識したOCIFに加え400 倍濃度の非標識OCIFを更に添加した結合試験用培地を加えた。CO₂ インキュベーター中 (5 % CO₂) 、37°Cで1時間培養した後、細胞を0.1 mg/ml のヘパリンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水 500 μl で2回洗浄した。この細胞に100 μg/mlのクロスリンキング剤、DSS (Disuccinimidyl suberate, Pierce社) を溶解させたリン酸塩緩衝生理食塩水 500 μl を加え、0 °Cで10分間反応させた。これらのウェルの細胞を0 °Cに冷却したリン酸塩緩衝生理食塩水 1 mlで2回洗浄した後、この細胞に1 % Triton X-100 (和光純薬社) 、2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride、シグマ社) 、10 μM ペプスタチン (和光純薬社) 、10 μM ロイペプチド (和光純薬社) 、

10 μM アンチパイン (antipain, 和光純薬社) 及び 2 mM EDTA (和光純薬社) を含む 20 mM Hepes 緩衝液 100 μl を加え、室温に 30 分間放置して細胞を溶解させた。これらのサンプル 15 μl を常法により還元条件下で SDS 化した後、SDS-電気泳動用ゲル (4 - 20% ポリアクリルアミドグラジエント、第一化学社) を用いて泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、BioMAX MS フィルム (コダック社) と BioMax MS 増感スクリーン (コダック社) を用いて -80 °C で 24 時間感光させた。感光させたフィルムを常法により現像した。この結果、¹²⁵I 標識モノマー型 OCIF と本発明 cDNA によりコードされる蛋白質をクロスリンクさせることにより、第 20 図に示すように、分子量約 90,000 - 110,000 の蛋白質バンドが検出された。

[実施例 24]

分泌型ヒト OBM の発現

(1) 分泌型ヒト OBM 発現プラスミドの構築

ヒト OBM SF (配列表配列番号 13) とマウス OBM #8 (配列表配列番号 6) を プライマー、pUC19hOBM を鋳型として PCR 反応を行った。この生成物をアガロースゲル電気泳動で精製した後、制限酵素 SphI、HindIII で切断し、さらにアガロースゲル電気泳動で精製して、0.27 kb の断片を得た。ヒト OBM cDNA を制限酵素 DraI で部分消化し、一ヶ所切断された断片をアガロース電気泳動で精製し、その精製断片をさらに制限酵素 HindIII で切断した。0.53 kb の DraI/HindIII 断片をアガロース電気泳動で精製し、この精製断片と上記の PCR 生成物の SphI、HindIII 断片 (0.27 kb) を pSec Tag A (インビトローゲン社) の SphI/EcoRV 断片 (5.2 kb) と共にライゲーションキット ver. 2 (宝酒造社) を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリ SDS 法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することによって、pSec Tag A に 0.27 kb と 0.53 kb の断片が挿入されたプラスミドを選び

出した。さらに、このプラスミドをタックダイデオキシターミネーターサイクルシークエンシングFSキット（パーキンエルマー社）を用いてシークエンスを行い、このプラスミドが分泌型ヒトOBM をコードする配列を持っていることを確認した。このプラスミドを制限酵素 NheI 、XhoIで切断した後、分泌型ヒトOBM cDNAに相当する断片（0.8 kb）をアガロースゲル電気泳動で回収した。この断片をライゲーションキットを用いて発現ベクター pCEP4（インビトローゲン社）のNheI/Xho I 断片（10.4 kb）に挿入し、その反応生成物を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS 法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することにより、目的の構造を持った分泌型ヒトOBM 発現プラスミド（pCEPshOBM）を持つ大腸菌株を選択した。pCEPshOBM を持つ大腸菌株を培養し、キアフィルタープラスミドミディキット（キアゲン社）を用いてpCEPsh OBM を精製した。

(2) 分泌型OBM の発現

293-EBNA細胞を10% FCSを含むIMDM (IMDM-10 % FCS) に懸濁し、コラーゲンコートした24ウェルプレート（住友ベークライト社）に 2×10^5 細胞／2 ml／ウェルになるように播種し、一夜培養した。この細胞に 1 μ g のpCEPshOBM 及びpCEP4 のそれぞれをリポフェクトアミン（ギブコ社） 4 μ l を用いて形質導入し、0.5 mlの無血清IMDMまたはIMDM-10 % FCS中で更に 2 日間培養し、その培養上清を回収した。分泌型ヒトOBM の培養上清中の発現は、以下のようにして確認した。即ち、培養上清に最終濃度が0.1 M になるように炭酸水素ナトリウムを加えて4 °Cで一夜放置し、培養上清中のヒトOBM を96ウェルプレートに固相化した。このプレートをPBS で4 倍希釈したブロックエース（雪印乳業社）溶液(B-PBS) で室温に2 時間放置しブロッキングした後、B-PBS で希釈した3-100 ng/ml のOC IFを加えて37°Cで2 時間放置した。0.05% Polysorbate 20 を含むPBS (P-PBS)

でプレートを洗浄した後、B-PBS で希釈したW096/26217号記載のパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体を各ウェルに100 μ l ずつ添加し、37°Cで2時間放置した。P-PBS で各ウェルを6回洗浄した後、TMB 溶液 (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek 社) を100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で約10分間放置した後、停止液 (Stopping Reagent, Scytek社) を100 μ l ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を第21図に示す。pCEPshOBMを形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、添加したOCIFの濃度に依存して450 nmの吸光度が増加した。一方、ベクターのみのpCEP4 を形質導入した細胞の培養上清を固相化した場合には、その吸光度の増加は見られなかった。又、固相化に用いる培養上清量の割合を5～90%の範囲で種々変化させ、一定濃度のOCIF (50 ng/ml) を添加した際の結果を第22図に示す。pCEPshOBM を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、添加する培養上清量の増加について450 nmにおける吸光度が増加したが、ベクターpCEP4 を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、吸光度の増加は見られなかった。これらの結果により、分泌型ヒトOBM がpCEPshOBM を形質導入した細胞の培養上清中に発現していることが確認された。

(実施例25)

チオレドキシン-ヒトOBM 融合蛋白質 (Trx-hOBM) の発現

(1) チオレドキシン-ヒトOBM 融合蛋白質 (Trx-hOBM) 発現ベクターの構築

10 μ l の10× ExTaqバッファー (宝酒造社)、8 μ l の 10mM dNTP (宝酒造社)、77.5 μ l の滅菌蒸留水、2 μ l のpUC19hOBM 水溶液 (10 ng/ μ l)、1 μ l のプライマーマウスOBM #3 (配列表配列番号9)(100pmol/ μ l)、1 μ l のプライマーhOBM Sa1R2 (配列表配列番号14)(100pmol/ μ l)、0.5 μ l のExTaq (5u/ μ l) (宝酒造社) を混合しマイクロ遠心管中でPCR 反応を行った。95°C 5分、50°C 1秒、55

°C 1分、74°C 1秒、72°C 5分の反応後、96°C 1分、50°C 1秒、55°C 1分、74°C 1秒、72°C 3分の反応を25サイクル行った。反応液全量から約750 bpの DNA断片を精製した。精製した DNA断片（全量）を制限酵素Sall I（宝酒造社）及びBspHI(ニューイングランドバイラブズ社)で切断した後、1%アガロース電気泳動を行い、約320 bpの DNA断片（断片1）を精製し20 μl の滅菌蒸留水に溶解した。同様に、実施例19-(3)記載のpUC19hOBM 4 μg を制限酵素BamHI, BspHI（宝酒造社）で切断して得られた約450 bpの DNA断片（断片2）、及び2 μg のpTrxFus(インビトロジェン社)を制限酵素BamHI, Sall I(宝酒造社)で切断して得られた約3.6 kbのDNA断片（断片3）をそれぞれ精製し、それぞれを20 μl の滅菌蒸留水に溶解した。DNA 断片の精製にはQIAEX II gel extraction kit を用いた。断片1、断片2、及び断片3をDNA ligation kit ver.2（宝酒造社）を用い、16°Cで2時間30分保温することにより結合させた。ライゲーション反応液を用い大腸菌GI724 株（インビトロジェン社）をThioFusion Expression System（インビトロジェン社）添付のInstruction Manualに記載の方法で形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株の中から、制限酵素切断により得られる DNA断片地図の解析並びに DNA配列の決定により、hOBM cDNA断片がチオレドキシン遺伝子に同じ読み枠で結合しているプラスミドを持つ菌株を選択した。得られた菌株をGI724/pTrxhOBMと名付けた。

(2) 大腸菌でのTrx-hOBMの発現

GI724/pTrxhOBM株及びpTrxFus を持つGI724 株(GI724/pTrxFus) をそれぞれ2 mlのRMG-Amp 培地 (0.6 % Na₂HPO₄、0.3 % KH₂PO₄、0.05% NaCl、0.1 % NH₄Cl、2 %カザミノ酸、1 %グリセロール、1 mM MgCl₂、100 μg/ml アンピシリン、pH 7.4) 中、37°Cで6時間振盪培養した。菌液 0.5 ml を50 ml のInduction 培地 (0.6 % Na₂HPO₄、0.3 % KH₂PO₄、0.05% NaCl、0.1 % NH₄Cl、0.2

% カザミノ酸、0.5 %グルコース、1 mM MgCl₂、100 μg/mlアンピシリン、pH 7.4) に添加し、30°Cで振盪培養した。OD_{600 nm} における値が約0.5 になった時点で、最終濃度が0.1 mg/ml になるようにL-トリプトファンを添加し、更に30 °Cで6 時間振盪培養した。菌液を3,000 × g で遠心し菌体を集め、12.5 ml のPBS に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置 (Ultrasonics 社) にかけ菌体を破碎し、7,000 × g で30分間遠心して上清を集めて可溶性蛋白質画分とした。これらの画分溶液10 μl ずつを還元条件下でのSDS-PAGE (10%ポリアクリルアミド) に供した。この結果、第23図に示すように、GI724/pTrxOBM の可溶性蛋白質画分には、GI724/pTrxFus の可溶性蛋白質画分には見られない分子量約40,000の蛋白質のバンドが検出された。以上の結果から、チオレドキシンとヒトOBM の融合蛋白質 (Trx-hOBM) が大腸菌中で発現していることが確認された。

(3) Trx-hOBM のOCIFとの結合能

発現させたTrx-hOBMがOCIFと結合することを、以下の実験により確認した。即ち、96ウェルイムノプレート(Nunc 社) の各ウェルに10 mM 炭酸水素ナトリウム水溶液で5000倍に希釈した抗チオレドキシン抗体 (インビトロジエン社) を100 μl ずつ添加し4 °Cで一夜放置した。各ウェル中の液を捨てた後、ブロックエース (雪印乳業社) をPBS で2倍希釈した溶液 (BA-PBS) を各ウェルに200 μl ずつ添加し室温で1 時間放置した。液を捨てた後、各ウェルをP-PBS で3回洗浄した。各ウェルにBA-PBSで段階希釈した上記 GI724/pTrxhOBM 由来及び GI724/pTrxFus由来可溶性蛋白質画分溶液を 100 μl ずつ添加し室温で2 時間放置した。P-PBS で各ウェルを3回洗浄した後、BA-PBSで希釈したOCIF(100ng/ml)を各ウェルに 100 μl ずつ添加し室温に2 時間放置した。P-PBS で各ウェルを3回洗浄した後、BA-PBSで2000倍に希釈したW096/26217号記載のパーオキシダーゼ標識した抗OCIF 抗体を各ウェルに100 μl ずつ添加し、室温で2 時間放置した。P-PBS で各ウェ

ルを6回洗浄した後、TMB溶液を100μlずつ各ウェルに加え、室温で約10分間放置した後、停止液(Stopping Reagent)を100μlずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を第24図に示す。GI724/pTrxFus由来可溶性蛋白質画分溶液を添加したもの、添加しなかったものの間で吸光度には差異は見られなかつたが、GI724/pTrxhOBM由来可溶性蛋白質画分溶液を添加したものでは、その添加濃度が増加するにつれて吸光度が上昇した。又、添加する可溶性蛋白質画分溶液の希釈割合を一定(1%濃度)にし、BA-PBSで段階希釈したOCIF(0-100ng/ml)を添加した場合の実験結果を第25図に示す。GI724/pTrxFus由来可溶性蛋白質画分溶液を用いたものでは、OCIFの濃度に係わりなく吸光度は低値であったが、GI724/pTrxhOBMに由来可溶性蛋白質画分溶液を添加したものでは、OCIF濃度が増加するにつれて吸光度が増加した。これらの結果から、GI724/pTrxhOBMで生産されるTrx-hOBMには、OCIFと結合する能力があることが確認された。

(4) Trx-hOBMを生産する大腸菌の大量培養

GI724/pTrxhOBMをRMG-Amp寒天培地(0.6%Na₂HPO₄、0.3%KH₂PO₄、0.05%NaCl、0.1%NH₄Cl、2%カザミノ酸、1.5%寒天、pH 7.4)に白金耳で塗抹し、30°Cで一夜培養した。菌体を10 mlのInduction培地に懸濁し、5 mlずつを500 mlのInduction培地の入った2 l用三角フラスコ計2本に添加し、30°Cで振盪培養した。OD_{600 nm}での吸光度が約0.5になった時点で最終濃度が0.1 mg/mlとなるようにL-トリプトファンを添加し、更に30°Cで6時間振盪培養した。菌液を3,000 × gで20分間遠心分離して菌体を集め、菌体を160 mlのPBSに懸濁した。懸濁液を超音波発生装置(Ultrasonics社)にかけ菌体を破碎し、7,000 × gで30分間遠心分離して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。

(5) OCIF固定化アフィニティカラムの調製

TSKgel AF-トレシルトヨパール650（東ソー社）2gと、W096/26217号公報記載の方法で調製した遺伝子組み換え型OCIF 35.0 mgを含む1.0Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）40mlとを混合し、4°Cで一夜緩やかに振盪することによりカップリング反応を行った。過剰な活性基を不活性化するため、遠心分離により上清を除去した後、40mlの0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH 7.5）を沈殿した担体に加え、室温で1時間緩やかに振盪した。0.01% Polysorbate 80と0.2M NaClを含む0.1Mグリシン-塩酸緩衝液（pH 3.3）及び0.01% Polysorbate 80と0.2M NaClを含む0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.0）を通液しカラムを洗浄した後、0.01% Polysorbate 80を含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）で2回洗浄し、カラムを平衡化した。

(6) OCIF固定化アフィニティーカラムによるTrx-hOBMの精製

Trx-hOBMの精製は、特に断らない限り4°Cで行った。上記のOCIF固定化アフィニティー担体（10ml）と上記実施例25-(4)記載の可溶性蛋白質画分溶液（120ml）とを混合後、50ml遠心管（4本）中で、ローターを用いて4°Cで一夜緩やかに振盪した。この混合液中の担体をエコノカラム（内径1.5cm×長さ15cm、バイオラッド社）に充填した。0.01% Polysorbate 80を含むPBS 300ml、0.01% Polysorbate 80及び2.0M NaClを含む10mMリン酸緩衝液（pH 7.0）100ml、0.01% Polysorbate 80及び0.2M NaClを含む0.1Mグリシン-塩酸緩衝液（pH 3.3）100mlを順次通液してカラムを洗浄した。次に、0.01% Polysorbate 80及び0.2M NaClを含む0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.0）を通液し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は5mlずつ分取した。分取した画分には、10%容量の2Mトリス溶液（pH 8.0）を加えて直ちに中和した。溶出液各画分中のTrx-hOBMの有無を、実施例25-(3)記載の方法により調べた。又、Trx-hOBMを含む画分を集め、更に精製を進めた。

(7) ゲル濾過によるTrx-hOBMの精製

上記実施例25-(6)記載のTrx-hOBMフラクション約 25 mlをCentriplus 10 及び Centricon 10 (Amicon社) を用いて、約 0.5mlに遠心濃縮した。この濃縮サンプルを予め0.01% Polysorbate 80 を含むPBS で平衡化したSuperose 12 HR 10/30 カラム(1.0×30cm、ファルマシア社) に負荷した。移動相として0.01% Polysorbate 80 を含むPBS を用い、流速0.25 ml/min でカラムを開いた。カラムからの溶出液は0.25mlずつ分取した。分取した画分のTrx-hOBMは、実施例25-(3)記載の方法及びSDS-PAGEにより検出した。純化されたTrx-hOBMを含むフラクションを集め、Trx-hOBMの蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度は牛血清アルブミンを標準品として用い、DC-protein assay kit (バイオラッド社) で測定した。

〔実施例26〕

hOBM の破骨細胞形成誘導活性

phOBM 及びpcDL-SR α 296 をリポフェクトアミン（ギブコ社）を用いてCOS-7 細胞にそれぞれトランスフェクトした。それぞれの細胞を10% FCSを含むDMEMで 1 日間培養後トリプシン処理し、カバーガラス(15 mm丸形、マツナミ社) を敷いた24ウェルプレートに1ウェル当たり 5×10^4 個の細胞を播種し、さらに2日間 培養した。培養プレートをPBS で1回洗浄した後、1%パラフォルムアルデヒド を含むPBS を加えて室温で8分間インキュベートし細胞をカバーガラス上に固定化した。細胞を固定化したプレートをPBS で6回洗浄した後、 10^{-8} M 活性化ビタミンD₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、10%牛胎児血清を含む α -MEMにて 1×10^6 個/ml になるように懸濁したマウス脾臓細胞を1ウェル当たり $700 \mu l$ ずつ添加した。各ウェル上にMillipore PCF(ミリポア社) をセットし、上記培地にて 4×10^4 個/ml に懸濁したST2細胞をMillipore PCF 中に $700 \mu l$ ずつ添加し、37°C で6日間培養した。培養終了後、Millipore PCF を取り除き、プレートをPBS で

1回洗浄後、アセトン-エタノール溶液(50:50)で1分間細胞を固定した後、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASEキット(シグマ社)を用いて破骨細胞特異的マークターである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP活性)を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、ヒトOBM cDNAを含まないベクターのみのpcDL-SR α 296をトランスフェクトしたCOS-7 細胞を固定化したウェル中にはTRAP活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、phOBM をトランスフェクトした細胞を固定化したウェル中には65±18個(n=3、平均値±標準偏差)のTRAP陽性細胞が観察された。又、これらのTRAP陽性細胞は¹²⁵I-標識サケカルシトニン(アマシヤム社)と特異的結合を示したことから、カルシトニンレセプターを発現していることが確認された。これらの結果から、本発明cDNAによりコードされる蛋白質であるヒトOBM は破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

(実施例27)

Trx-hOBM及び分泌型ヒトOBM による破骨細胞形成誘導活性

マウス脾臓細胞を10⁻⁸M 活性型ビタミンD₃、10⁻⁷M デキサメサン、10%牛胎児血清を含むα-MEMに2×10⁶ 個/ml になるように懸濁し、24ウェルプレートに1 ウェルあたり350 μl 添加した。精製したTrx-hOBMを上記培地で希釈した溶液(40 ng/ml)、pCEPshOBM またはpCEP4 を形質導入した293-EBNA細胞をIMDM-10 %FBS で培養した培養上清を上記培地にて10倍希釈した溶液または上記培地のみをそれぞれ350 μl 添加した後、Millicell PCF (ミリポア社) を各ウェルにセットし、上記培地にて懸濁した4×10⁴ 個/ml のST2 細胞をMillicell PCF に600 μl 添加した。6 日間培養した後、Millicell PCF を取り除き、プレートをPBS で1回洗浄後、アセトン-エタノール溶液(50:50)で1分間細胞を固定した後、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE キット(シグマ社)を用いて酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP活性)を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結

果、Trx-hOBMを添加しなかったウェル中にはTRAP活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、Trx-hOBMを添加したウェルには115 ±19個（n=3、平均値±標準偏差）のTRAP陽性細胞が観察された。同様に、pCEP4で形質導入された293-EBNAの培養上清を添加したウェル中にはTRAP活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、pCEPshOBMで形質導入された293-EBNAの培養上清を添加したウェルには125 ±23個（n=3、平均値±標準偏差）のTRAP陽性細胞が観察された。又、これらTRAP陽性細胞は¹²⁵I標識したサケカルシトニン（アマシャム社）と特異的結合を示したことから、カルシトニンレセプターを発現していることが確認された。これらの結果から、Trx-hOBM及び分泌型OBMには、破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

〔実施例28〕

ポリクローナル抗体の作製

免疫抗原として用いるマウス sOBM 又はヒトsOBMは、前記の方法に従って得た。即ち、マウス sOBM cDNA（マウスOBM のN末端から72番目までのアミノ酸を欠損させた膜結合部位を持たないマウス s OBM(配列表配列番号16) をコードするcDNA、配列表配列番号18) 又はヒト OBM cDNA（ヒト OBM のN末端から71番目までのアミノ酸を欠損させた膜結合部位を持たないヒト s OBM(配列表配列番号17) をコードするcDNA、配列表配列番号19) を、イムノグロブリンのκ-チェーンのシグナルペプチドをコードする塩基配列を含む発現ベクターpSec TagA(インビトローゲン社) のHind III/EcoR V断片 (5.2kb)と、OBM cDNAのEcoRI/PmaCI 断片(0.32kb)とともにライゲーションキットver.2(宝酒造社) を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株からアルカリSDS 法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することによりpSec TagA に0.6Kb と0.32kbの断片が挿入されたプラスミドを選び出した。

このプラスミドをダイターミネーターサイクルシークエンシングFSキット（パー
キン＝エルマー社）を用いてシークエンスを確認した結果、このプラスミドがマ
ウス又はヒト sOBM をコードする配列を有することを確認した。このプラスミド
を制限酵素NheI、XhoIで切断した後、分泌型OBM cDNAに相当する断片（1.0kb）を
アガロースゲル電気泳動で回収した。この断片をライゲーションキットを用いて
発現ベクターpCEP4(インビトローゲン社)のNheI/XhoI 断片（10.4kb）に挿入し、
その反応生成物を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐
性株からアルカリSDS 法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断して解析す
ることにより、目的の構造を持った分泌型OBM 発現プラスミド（pCEP sOBM）を持
つ大腸菌株を選び出した。pCEP sOBM を持つ大腸菌株を培養し、キアフィルター
プラスミドミディキット（キアゲン社）を用いてpCEP sOBM を精製した。次に、
293-EBNA細胞を10%FCS を含むIMDM (IMDM-10 %FCS)に懸濁し、コラーゲンコー
トした 24 ウェルプレート（住友ベークライト社）に 2×10^5 個/2ml/ ウェルにな
るように播種し、一夜培養した。この細胞に 1 μ g のpCEP sOBM 又はpCEP4 をリ
ポフェタミン（ギブコ社） 4 μ l を用いて形質導入し、0.5ml の無血清IMDM又は
IMDM-10 %FCS 中でさらに 2 日間培養し、その培養上清を回収した。遺伝子組み
換えマウス可溶性 OBM(msOBM) あるいはヒト可溶性OBM(hsOBM)の高生産細胞株を
以下のようにスクリーニングした。msOBM あるいはhsOBM を含むと見られる培養
上清に最終濃度が0.1Mになるように炭酸水素ナトリウムを添加後、それぞれの培
養上清を100 μ l づつ96ウェルイムノプレート（Nunc社）の各ウェルに添加し、
4 °Cで一夜放置して培養上清中のmsOBM あるいはhsOBM を各ウェルに固相化した
。このプレートの各ウェルにPBSで4倍希釗したブロックエース（雪印乳業社）
溶液(B-PBS)を 200 μ l 加え、室温で2時間放置した。0.1 %polysprbate 20を
含むPBS(P-PBS)で3回洗浄後、B-PBSで段階的に希釗した遺伝子組み換えOCIF (

rOCIF)溶液(3～100ng/ml)を100μlずつ各ウェルに添加し、37°Cで2時間放置した。そのプレートをPBSで3回洗浄した後、B-PBSで希釈したパーオキシダーゼ標識抗OCIFポリクローナル抗体(W096/26217号)を100μlずつ各ウェルに添加し、37°Cで2時間放置した。P-PBSで各ウェルを6回洗浄後、TMB溶液(TMB Soluble Agent, High sensitivity, Scytek社)を100μlずつ各ウェルに加え、室温で約10分間放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek社)を100μlずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。msOBMあるいはhsOBMの生産細胞株の培養上清を固相化したプレートでは、OCIFの添加濃度に比例して、吸光度が顕著に増加した。msOBMあるいはhsOBMの生産細胞株について、その吸光度の増加の割合の高い生産株を、それぞれ高生産株として選択した。このように選択されたmsOBMあるいはhsOBM高生産293-EBNA細胞をそれぞれ5%FCSを含有するIMDMを培地として用い、T-フラスコ(T-225)を25枚用いて大量培養した。コンフルエントに達した後、新鮮な培地をT-225 フラスコ1枚当たり100mlずつ加え、3～4日間培養して、培養上清を回収した。この操作を4回繰り返して、msOBMあるいはhsOBMを含む培養上清をそれぞれ10リットル得た。実施例25-(6)及び(7)記載の方法に従いrOCIF固定化カラムを用いたアフィニティーコロマトグラフィーおよびゲルfiltrationクロマトグラフィーにより精製することにより、これら培養上清からSDS-ポリアクリルアミド電気泳動的に均一(分子量32kDa)な精製msOBM及びhsOBMをそれぞれ約10mg及び12mg得た。このようにして得られた精製標品を、それぞれ免疫抗原として用いた。得られた各抗原を、リン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)に200μg/mlになるように溶解し、等容量のフロイント完全アジュバントと混合し乳化後、日本白色ウサギ各3羽に約1週間間隔で1mlを皮下投与し免疫した。抗体価を測定し、抗体価が最高に到達した時点で、ブースター投与し、投与10日後に全採血した。抗体価が最高に到達した時点で、ブースター投与し、投与10日後に全採血した。

血清をプロテインAセファロースクロマトグラフィー用バインディングバッファー(BioRad社)で2倍希釈し、同バッファーで平衡化したプロテインAカラムに負荷した。同バッファーでカラムを充分洗浄後、カラムに吸着した抗sOBM抗体をエルーションバッファー(BioRad社)あるいは0.1Mグリシン-HClバッファー、pH 2.9-3.0で溶出した。抗体溶出液を直ちに中和する目的で、1.0MTris-HCl、pH 8.0を少量含む試験管を用いて溶出溶液を分画した。抗体溶出液をPBSに対して4°C、一夜透析した。抗体溶液の蛋白量をウシIgGをスタンダードとしてLowry法により測定した。このようにして、本発明のポリクローナル抗体を含む精製イムノグロブリン(IgG)が、ウサギ抗血清1ml当たり約10mg得られた。

〔実施例29〕

ポリクローナル抗体を用いたELISAによるOBM及びsOBMの測定

実施例28で得られたウサギ抗ヒトsOBMポリクローナル抗体を、固相抗体及び酵素標識抗体としたサンドイッチELISAを構築した。酵素標識は、石川らの方法(Ishikawa et al.: J. Immunoassay, Vol. 4, 209-327, 1983)に従いパーオキシダーゼ(POD)標識した。実施例28で得られた抗ヒトsOBMポリクローナル抗体を2μg/mlとなるように0.1MNaHCO₃溶液に溶解し、96-ウェルイムノプレート(Nunc社)の各ウェルに100μlずつ添加、室温で一夜放置した。次いで、各ウェルに200μlずつ50%ブロックエース(雪印乳業社)を加え、室温で1時間放置し、各ウェルを0.1%polysorbate 20を含むPBS(洗浄バッファー)で3回洗浄した。実施例26の方法と同様にヒトOBMを発現し実施例2の方法で精製することにより得られた精製ヒトOBM、及び実施例28で得られた精製ヒトsOBMをそれぞれ一次反応用バッファー(40%ブロックエース、0.1%polysorbate 20を含む0.2MTris-HClバッファー、pH 7.2)で段階希釈した溶液を、100μlずつ各ウェルに加えた。室温で2時間放置後、各ウェルを上記洗浄バッファーで3回洗浄した。

実施例26の方法と同様にヒトOBM を発現し実施例2の方法で精製することにより得られた精製ヒトOBM 、及び実施例28で得られた精製ヒトsOBM をそれぞれ一次反応用バッファー (40% ブロックエース、 0.1 % polysorbate 20 を含む0.2 M Tris-HClバッファー、 pH 7.2) で段階希釈した溶液を、 100 μ l ずつ各ウェルに加えた。室温で2時間放置後、各ウェルを上記洗浄バッファーで3回洗浄した。二次反応用バッファー (25% ブロックエース、 0.1 % polysorbate 20 を含む0.1 M Tris-HClバッファー、 pH 7.2) で1000倍希釈したPOD 標識抗ヒトsOBM ポリクローナル抗体を100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した後、各ウェルを3回洗浄バッファーで洗浄した。各ウェルに酵素基質溶液 (TMB, ScyTek 社) を100 μ l ずつ添加し、室温で10分間放置後、反応停止液 (Stopping reagent, ScyTek社) を100 μ l ずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止させた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。結果を第26図に示す。ウサギ抗ヒトsOBMポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA は、ヒトsOBM (分子量約32kDa) 及びヒトOBM(分子量約40kDa) をほぼ等しく認識し、それぞれの測定感度は約 12.5×10^{-3} pmol/ml (ヒトOBM で約500pg/ml、ヒトsOBMで約400pg/ml) であった。実施例28で得られたウサギ抗マウスsOBMポリクローナル抗体を用いたELISA によるマウスsOBM及びマウスOBM の測定は上記と同様に実施でき、それぞれの測定感度も同程度で極めて微量のマウス sOBM あるいはマウスOBM を測定できることが明らかとなった。

以上のように、実施例28で得られた本発明抗ヒトsOBMポリクローナル抗体は、ヒトsOBM及びヒトOBM の両抗原を等しく認識することから、抗ヒトOBM/sOBMポリクローナル抗体と名付けた。又、実施例28で得られた抗マウスsOBMポリクローナル抗体は、同様にマウスsOBM及びマウスOBM の両抗原を等しく認識することから、抗マウスOBM/sOBMポリクローナル抗体と名付けた。

〔実施例30〕

モノクローナル抗体の作製

免疫用抗原には、実施例28で得られた精製ヒトsOBMを用いた。精製ヒトsOBMを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように生理食塩水に溶解した。このようにして調製したヒトsOBM溶液に、同容量のフロイント完全アジュvantを加え良く乳化した後、それぞれの抗原をBalb/cマウス一匹当たり腹腔内に $200\mu\text{l}$ ずつ1週間間隔で3回投与し、マウスを免疫した。次に、ヒトsOBMを $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む生理食塩水に同容量のフロイント不完全アジュvantを添加し、充分乳化したものを上記Balb/cマウス一匹あたり $200\mu\text{l}$ ずつ、1週間間隔で4回追加免疫した。4回目の追加免疫の1週間後、ブースターとしてヒトsOBMを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む生理食塩水をBalb/cマウス1匹当たり $100\mu\text{l}$ ずつ静脈内に投与した。最終免疫後3日目に脾臓を摘出、脾臓細胞を分離し、マウスミエローマ細胞 P3x63-AG8.653とを公知の方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495(1975))に従い細胞融合した。融合終了後、細胞懸濁液をヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含むHAT培地内で10日間培養した。ミエローマ細胞が死滅し、ハイブリドーマが出現した後、HT培地からアミノブテリンを除いたHT培地に培地交換し、培養を継続した。

〔実施例31〕

ハイブリドーマの選択及びクローニング

実施例30の細胞融合及び培養を開始して10日後にハイブリドーマの出現を認めたので、下記に記載した改良ソリッドフェーズELISAにより、ヒトsOBMを認識する高親和性抗体及びその抗体を産生するハイブリドーマの選択を行った。又、ヒトsOBMとマウスsOBMの両方を認識する抗OBM モノクローナル抗体を選択するために、ソリッドフェーズELISA用抗原として、ヒトsOBM以外に実施例27で得られたマウスsOBMも使用した。ヒトsOBM及びマウスsOBMをそれぞれ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう

に0.1M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、それぞれの抗原溶液を50 μ l ずつ96－ウェルイムノプレート(Nunc 社) の各ウェルに加え、4 °Cで一夜静置しそれぞれの抗原を固相化した。各ウェル中の抗原溶液を捨て、各ウェルに50%ブロックエース(雪印乳業社) を200 μ l ずつ加え、室温で1時間放置してブロッキングした。各ウェルを0.1 % polysorbate 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS-P) で洗浄し、各ウェルに40 μ l の牛血清(ハイクローン社) を加えた。次いで、各ウェルに10 μ l のハイブリドーマ培養上清を加え、80%血清濃度下、室温で2時間反応させた。80%血清存在下でのソリッドフェーズELISA の目的は、高濃度の蛋白質及び血清由来の免疫反応妨害物質等の存在中でも微量のヒトsOBMあるいはマウスsOBMと結合できる抗体、即ちヒトsOBMあるいはマウスsOBMに対して高親和性の抗体生産ハイブリドーマを選択するためである。室温で2時間反応後、プレートをPBS-P で洗浄し、25%ブロックエースを含む生理食塩水で5000分の1に希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG (KPL社) を各ウェルに50 μ l 加え、室温で2時間反応させた。プレートをPBS-Pで3回洗浄した後、各ウェルに50 μ l の酵素基質溶液(TMB, ScyTek社) を加え、室温で5分間反応させた。次いで、反応停止液(stopping reagent, ScyTek社) 50 μ l を加えて酵素反応を停止させた。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(イムノリーダーNJ2000、日本インターメッド社) を用いて測定し、ヒトsOBMあるいはマウスsOBMを認識する抗体生産ハイブリドーマを選択した。特に高い吸光度(OD_{450nm})を示すそれぞれの抗体生産ハイブリドーマを選択し、それらを限界希釈法により3～5回クローニングを繰り返すことにより、安定な抗体生産ハイブリドーマを樹立した。得られた抗体生産株の中から、さらに抗体の生産性が高いハイブリドーマ株を選別した。

〔実施例32〕

モノクローナル抗体の生産及び精製

実施例31で得られた抗体、即ち高親和性でヒトsOBMを認識する抗体生産ハイブリドーマ及びマウスsOBMにも交差性を有する抗体を產生するハイブリドーマをそれぞれ培養し、マウス一匹当たりそれぞれのハイブリドーマを 1×10^6 細胞ずつ、約1週間前にプリスタン（アルドリッヂケミカル社）を投与しておいたBalb/c系マウスの腹腔内に移植した。約2～3週間後、蓄積した腹水を採取し、本発明のヒトsOBMあるいはヒトsOBM及びマウスsOBMを認識するモノクローナル抗体を含む腹水を得た。実施例28に記載したプロテインAカラムによる抗OBM/sOBMポリクローナル抗体の精製法に準じて、プロテインAカラム（ファルマシア社）クロマトグラフィーにより腹水から精製モノクローナル抗体を得た。

〔実施例33〕

モノクローナル抗体の抗原特異性

ヒトsOBMを特異的に認識するモノクローナル抗体並びにヒトsOBM及びマウスsOBMにも交差性を有するモノクローナル抗体について、ヒトsOBM、膜結合部位を有するintactなヒトOBM、マウスsOBM、及び膜結合部位を有するintactなマウスOBMを抗原とした時の抗原特異性について調べた。30数種類のモノクローナル抗体を得たが、それらのうち代表的なモノクローナル抗体についての結果を第1表に示す。この結果、ヒトsOBMを特異的に認識する抗ヒトsOBMモノクローナル抗体のほとんど全ては膜結合部位を有するintactなヒトOBMも認識するが、マウスsOBM及び膜結合部位を有するintactなマウスOBMは認識しないことが明らかとなった。

一方、ヒトsOBM及びマウスsOBMも認識するモノクローナル抗体も得られたが、その数は極めて少なく、これらの抗体はヒトOBM並びにマウスOBMにも交差性を有していることがわかった。これらの結果は、ヒトOBMとマウスOBMには共通した抗原認識部位、即ちエピトープが存在していることを示すものである。ヒトsO

BMを免疫抗原として作製した抗ヒトsOBMモノクローナル抗体は、膜結合型のintactな蛋白質であるヒトOBMも等しく認識することから、抗ヒトsOBMモノクローナル抗体を抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体と名付けた。

第1表

抗体名	抗 原			
	hsOBM	hOBM	msOBM	mOBM
H-OBM 1	+	+	-	-
H-OBM 2	+	+	-	-
H-OBM 3	+	+	-	-
H-OBM 4	+	+	-	-
H-OBM 5	+	+	-	-
H-OBM 6	+	+	-	-
H-OBM 7	+	+	-	-
H-OBM 8	+	+	-	-
H-OBM 9	+	+	+	+
H-OBM 10	+	+	-	-
H-OBM 11	+	+	-	-
H-OBM 12	+	+	-	-
H-OBM 13	+	+	+	+
H-OBM 14	+	+	-	-

(hsOBM: ヒト可溶性OBM、hOBM: ヒト膜結合型 OBM、
msOBM: マウス可溶性OBM、mOBM: マウス膜結合型 OBM)

〔実施例34〕

モノクローナル抗体のクラス及びサブクラスの検定

本発明のモノクローナル抗体のクラス及びサブクラスを、イムノグロブリンクラス及びサブクラス分析キット（アマシャム社）を用いて検定した。検定は、キットに指示されているプロトコールに従い実施した。代表的なモノクローナル抗体についての結果を第2表に示す。抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体の大多数はIgG₁であり、その他IgG_{2a}及びIgG_{2b}も存在していた。又、いずれの抗体もライトチェーンはκ鎖であった。

第2表

抗体名	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	κ
H-OBM 8	-	+	-	-	-	+
H-OBM 9	+	-	-	-	-	+
H-OBM 10	+	-	-	-	-	+
H-OBM 11	+	-	-	-	-	+
H-OBM 12	-	-	+	-	-	+
H-OBM 13	+	-	-	-	-	+
H-OBM 14	+	-	-	-	-	+

〔実施例35〕

モノクローナル抗体の解離定数(K_d 値) の測定

公知の方法 (Betrand Friguet et al.: Journal of Immunological Methods, 7 7, 305-319, 1986) に従い、モノクローナル抗体の解離定数を測定した。即ち、実施例32で得られた精製抗体を5ng/mlに40%プロックエース、0.1 % polysorbate 20を含む0.4M Tris-HCl pH7.4(1次バッファー) で希釈し、これに実施例28で得られた精製ヒト可溶性OBM(hsOBM)を 6.25ng/ml～10 μ g/mlになるように1次バッファーで希釈したものを等容量混ぜ、4 °Cで15時間静置することによりhsOBMとモノクローナル抗体を結合させた。15時間後、hsOBMと未結合の抗体をhsOBM(10 μ g/ml、100 μ l/ウェル)を固相化したソリッドフェーズELISAにて測定することにより、モノクローナル抗体のhsOBMに対する解離定数を算定した。又、hsOBMに対するモノクローナル抗体でありながら、マウス可溶性OBM(msOBM)にも交叉する抗体のmsOBMに対する親和性についても、上記のhsOBMの代わりにmsOBMを使用することにより同様に測定した。特に、各抗原に高い親和性を示し、酵素免疫測定法やその他バインディングアッセイ等に有用な抗体についての結果を第3表に示す。

第3表

抗体名	サブクラス	抗原	解離定数 Kd (M)
H-OBM 1	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < Kd < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 4	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < Kd < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-9} < Kd < 1 \times 10^{-8}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	msOBM	$1 \times 10^{-8} < Kd < 1 \times 10^{-7}$

この結果、ヒト可溶性OBM (hsOBM) に特異的な抗体であるH-OBM 1 及びH-OBM 4 は解離定数 (Kd) が 10^{-11}M オーダーで、hsOBM に極めて高い親和性を有していることが明らかになった。一方、hsOBM 及びマウス可溶性OBM (msOBM) の両方を認識する抗体、H-OBM 9 のKd値は、msOBM に対しては 10^{-8}M オーダーであり、hs OBM に対しては 10^{-9}M オーダーであった。又、第1表に記載の両抗原を認識する他の抗体、H-OBM 13の両抗原に対する解離定数は、H-OBM 9 と差異はなく、両抗体はサブクラスも一致していることから、同じエピトープを認識する同一抗体である可能性が示唆された。

[実施例36]

抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによるヒトOBM及びsOBMの測定方法

実施例35で得られた2種類の高親和性モノクローナル抗体、H-OBM 1 及びH-OBM 4 をそれぞれ固相抗体と酵素標識抗体として、サンドイッチELISA を構築した。抗体の標識は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピアス社）を用いて行った。H-OBM 1 抗体を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう 0.1M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、 $100\ \mu\text{l}$ ずつ96-ウェルイムノプレート (Nunc社) の各ウェルに加え、 4°C で一夜静置し固相化した。各ウェルの溶液を捨て、50%濃度のプロックエース

300 μ l を加え、室温で2時間静置しプロッキングした。プロッキング後、プレートを0.1% polysorbate 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS-P) で洗浄した。ヒト可溶性sOBM及びヒトOBM をそれぞれ40%ブロックエース(雪印乳業社) 及び 0.1% polysorbate 20(和光純薬社) を含む0.4M Tris-HCl (pH 7.4)(1次反応バッファー) に溶解、希釈し、種々の濃度の被験溶液を調製した。種々の濃度に調製したそれぞれの被験溶液を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。2時間後、プレートをPBS-P で洗浄し、25%ブロックエース及び0.1% polysorbate 20 を含む0.2M Tris-HCl(pH7.4)(2次反応バッファー) で希釈したPOD 標識H-OBM 4 抗体を各ウェルに100 μ l 加え、室温で2時間反応させた。プレートをPBS-P で洗浄した後、各ウェルに100 μ l の酵素基質溶液(TMB, ScyTek社)を加えて発色させた後、反応停止液(stopping reagent, ScyTek社) を100 μ l ずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの450nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。結果を第27図に示す。

この結果、実施例35で得られた2種類の高親和性抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 1 及びH-OBM 4 を用いて構築したサンドイッチELISA は、ヒトOBM 及びヒトsOBMを等しく認識し、その測定感度は約 $1.25-2.5 \times 10^{-3}$ pmol/ml(分子量約40kDa のヒトOBM では約50-100pg/ml、分子量約32kDa のヒトsOBMでは約40-80pg/ml) で極めて微量のヒトOBM 及びヒトsOBMを測定できることが明らかとなった。尚、これら2種類の抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 1 及びH-OBM 4 を生産するハイブリドーマをH-OBM1及びH-OBM4と命名し、またマウスOBM 及びマウスsOBMも認識し、破骨細胞形成抑制活性を発揮する抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 9 を生産するハイブリドーマをH-OBM9と命名した。これらのハイブリドーマは、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-6264(H-OBM1)、FERM BP-6265(H-OBM4)、及びFERM BP-6266(H-OBM9)と

して、平成9年11月5日にそれぞれ寄託されている。

〔実施例37〕

マウスOBM 及びマウスsOBMを認識する抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体を用いたマウスOBM 及びマウスsOBMの測定

実施例33及び35で得られたマウスOBM 及びマウスsOBMも認識する抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM9を固相抗体とし、実施例28で得られた抗マウスOBM/sOBMポリクローナル抗体を酵素標識抗体とするサンドイッチELISAを構築した。マウスOBM 及びマウスsOBMをそれぞれ実施例35と同様に一次反応用バッファーで段階的に希釈し、実施例36と同様の方法によりマウスOBM 及びマウスsOBMを測定した。結果を第28図に示す。この結果、本発明のマウスOBM 及びマウスsOBMも認識する本発明の抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 9 を使用することにより、マウスOBM 及びマウスsOBMを同様に測定できることが確認された。実施例35の結果に示すように、この抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 9 はマウスsOBMに対する解離定数が高い、即ちマウスsOBMに対する親和性が比較的低いことから、本ELISAによるマウスOBM(分子量約40kDa)及びマウスsOBM(分子量約32kDa)の測定感度は、約 25×10^{-3} pmol/ml(マウスOBMでは約1ng/ml、マウスsOBMでは約0.8ng/ml)程度であった。

〔実施例38〕

抗OBM/sOBM抗体による破骨細胞形成抑制活性試験

マウス脾細胞とST2 細胞(マウス骨髄由来間質細胞)とのco-cultureでosteoclast-like cell(OCL)が誘導されることが知られている(Endocrinology, 125, 1805-1813(1989))。そこで、OBM/sOBM抗体をこのco-cultureに添加した時、OCL誘導を抑制するか否かを検討した。このco-culture系においてはマウスOBMが発現しているので、実施例に使用する抗体はマウスOBMを認識するウサギ抗マウス

OBM/sOBMポリクローナル抗体、及びヒトOBM 及びマウスOBM の両抗原を認識するヒト抗OBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 9 を用いた。10% FCSを含む α MEMにて段階希釈したそれぞれのOBM 抗体を24 well plate(ヌンク社) に700 μ l/we 11、上記培地にて懸濁した雄マウス脾細胞 (2×10^6 /ml) を350 μ l/well添加した。次いでトリプシナイズしたST2 細胞を 4×10^{-8} M Vitamin D₃ 及び 4×10^{-7} M Dexamethazone を含む上記培地に懸濁し (8×10^4 cells/ml) 350 μ l/well添加し、37°Cで6日間培養した。培養プレートをPBS にて1回洗浄したのち、50%エタノール、50%アセトンの混合液にて室温で1分間固定した。プレートを風乾した後、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASEキット (シグマ社) のプロトコールに従い基質液を 500 μ l/well添加し、37°Cで55分間反応させた。この反応により破骨細胞特異的マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP 活性) を示す細胞のみが染色される。プレートを蒸留水で1回洗浄した後風乾してTRAP陽性細胞数をカウントした。結果を第4表に示す。この結果、ウサギ抗マウスOBM /s OBM ポリクローナル抗体及びマウスOBM を認識する抗ヒトOBM/sOBMモノクローナル抗体、H-OBM 9 とも抗体濃度に依存してOCL 誘導を阻害することがわかった。これらの抗体は、破骨細胞形成因子、OCIF/OPGと同様に破骨細胞形成抑制活性を有し、骨代謝異常症治療薬として有望であることが明らかになった。

第4表

抗体添加量 (ng/ml)	TRAP 陽性多核細胞数	
	ウサギ 抗マウス OBM/sOBM ポリクローナル 抗体	マウス 抗ヒトOBM/sOBM モノクローナル 抗体 (H-OBM 9)
0	1155 ± 53	1050 ± 45
10	510 ± 24	650 ± 25
100	10 ± 3	15 ± 4

(平均±標準偏差、n=3)

〔実施例39〕

Trx-OBM のヒト破骨細胞形成誘導活性

成人健常者より静脈採取した全血から、Histopaque (sigma 社) を用い、添付のプロトコールに従いdensity gradient法によって単核細胞を調製した。この単核細胞を 10^{-7} M デキサメサゾン、200ng/mlマクロファージコロニー刺激因子（ミドリ十字社）、10%牛胎児血清及び実施例15で得られた精製されたTrx-OBM (0-100ng/ml)を含む α -MEMに 1.3×10^6 /mlになるように懸濁し、この懸濁液を48ウェルプレートに1ウェルあたり $300 \mu\text{l}$ 添加し3日間37°Cで培養した。培養液を上記培地で交換後、さらに4日間37°Cで培養した。培養した細胞を実施例5に示した方法で酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP活性)を示す細胞を選択的に染色し、染色された多核細胞の数を顕微鏡観察により測定した。結果を第29図に示す。この結果、Trx-OBMを添加しなかったウェル中にはTRAP活性を示す細胞はほとんど検出されなかったのに対し、Trx-OBMを添加すると濃度依存的にTRAP陽性多核細胞が出現した。又、これらのTRAP陽性多核細胞は破骨細胞のマーカーであるビトロネクチンレセプターも陽性であった。さらに、同様の培養を48ウェルプレートに静置した象牙質切片上で行うと、Trx-OBM存在下でのみ象牙質切片上に吸収窩が形成された。これより、Trx-OBMにはヒト破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

〔実施例40〕

抗OBM/sOBM抗体による骨吸収抑制活性

妊娠15日目のddYマウス（日本SLC社）に [^{45}Ca]-CaCl₂溶液 (Amersham社) を1匹あたり $25 \mu\text{Ci}$ 皮下注射し、胎仔の骨を ^{45}Ca でラベルした。翌日、マウスを屠殺し開腹して、子宮から胎仔を取り出した。胎仔より前肢を摘出して、皮膚及び筋肉を剥がし長管骨を摘出し、さらに軟骨を除去して長管骨の骨幹部のみにし

た。骨幹部は24穴プレートに入れた0.5ml の培養液(0.2 %牛血清アルブミン(sigma社)を含む BGJb medium(GIBCO BRL社))に1本ずつ浮かべ、37°C, 5%CO₂存在下で24時間培養した。前培養終了後、各種骨吸収因子(ビタミンD₃、プロスタグランジンE₂、副甲状腺ホルモン、インターロイキン1α)、及び正常ウサギIgG(100 μg/ml; 対照として)又は実施例28で得られたウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体を含む新しい培養液(0.5ml)に長管骨を移し、さらに72時間培養した。培養終了後、長管骨は0.5 mlの5%トリクロロ酢酸水溶液(和光純薬社)に入れ、室温で3時間以上処理して脱灰した。培養液及びトリクロロ酢酸抽出液(共に0.5ml)にシンチレーター(AQUASOL-2、PACKARD社)5mlを加え、⁴⁵Caの放射活性を測定し、骨吸収により培養液中に遊離した⁴⁵Caの割合を算出した。結果を第30図～第33図にそれぞれ示す。この結果、ビタミンD₃(10⁻⁸M)は骨吸収活性を上昇させたが、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体を加えることにより、濃度依存的にビタミンD₃による骨吸収を抑制し、100 μg/mlの濃度において完全に抑制した(第30図)。又、プロスタグランジンE₂(10⁻⁶M)あるいは副甲状腺ホルモン(100 ng/ml)は骨吸収活性を上昇させたが、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体の添加(100 μg/ml)により、プロスタグランジンE₂及び副甲状腺ホルモンによる骨吸収をほぼ完全に抑制した(第31図及び第32図)。一方、陽性対照として用いた正常ウサギIgG(100 μg/ml)は、プロスタグランジンE₂及び副甲状腺ホルモンによる骨吸収に対して影響しなかった。又、インターロイキン1α(10 ng/ml)によっても骨吸収が引き起こされたが、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体(100 μg/ml)により有意に抑制された(第23図)。これらの結果より、本発明抗体は骨吸収抑制物質として優れていることが明らかとなった。マウス抗ヒトOBM/sOBM抗体であるH-OBM 9についても同様の実験を行った結果、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体とほぼ同等の骨吸収抑制活性があることが確認さ

れた。

産業上の利用可能性

本発明により、破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitory factor;OCIF)に結合する新規な蛋白質、その製造方法、この蛋白質を用いて該蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法、該蛋白質の作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、該蛋白質と結合してその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、及びこれらのスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物、該蛋白質に対する抗体、及びその抗体を用いた骨代謝異常治療剤が提供される。

また、本発明により、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規な蛋白質(OCIF結合分子)をコードするDNA、そのDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、そのDNAを用いてOCIFに特異的に結合する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝治療剤が提供される。更に、OCIF結合分子の発現を調節するスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物が提供される。

さらに、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規なヒト蛋白質(ヒト由来OCIF結合分子、ヒトOBM)をコードするDNA、そのDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、そのDNAを用いてOCIFに特異的に結合する性質を有し、破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝異常症治療剤が提供される。OCIF結合分子の発現を調節する物質のスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合し、その作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合し、

その生物作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、及びこれらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物、さらにヒト由来OCIF結合蛋白質に対する抗体及びその抗体を用いた骨代謝異常症の予防及び／又は治療薬が提供される。

またさらに、本発明により、OCIFに特異的に結合する膜結合分子(OCIF binding molecule; OBM)蛋白質及び膜結合部位を欠損した可溶性OBM(sOBM) の両抗原を認識する抗体（抗OBM/sOBM抗体）、その製造方法、この抗体を用いたOBM 及びsOBMの測定方法、さらにこの抗体を有効成分とする骨代謝異常症予防及び／又は治療剤が提供される。

本発明により得られた蛋白質あるいは抗体は、医薬あるいは研究又は試験用試薬として有用である。

寄託された微生物への言及

(1) 微生物を寄託した寄託機関の名称及び宛て名：

通商産業省工業技術院生命工業工学技術研究所

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）

寄託機関に寄託した日付

平成9年5月23日

寄託機関に寄託について付した受託番号

FERM BP-5953

(2) 微生物を寄託した寄託機関の名称及び宛て名：

通商産業省工業技術院生命工業工学技術研究所

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）

寄託機関に寄託した日付

平成 9 年 8 月 13 日

寄託機関に寄託について付した受託番号

FERM BP-6058

(3) 微生物を寄託した寄託機関の名称及び宛て名;

通商産業省工業技術院生命工業工学技術研究所

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)

寄託機関に寄託した日付 (原寄託日)

平成 9 年 11 月 5 日

寄託機関に寄託について付した受託番号

FERM BP-6264

(4) 微生物を寄託した寄託機関の名称及び宛て名;

通商産業省工業技術院生命工業工学技術研究所

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)

寄託機関に寄託した日付 (原寄託日)

平成 9 年 11 月 5 日

寄託機関に寄託について付した受託番号

FERM BP-6265

(5) 微生物を寄託した寄託機関の名称及び宛て名;

通商産業省工業技術院生命工業工学技術研究所

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)

寄託機関に寄託した日付 (原寄託日)

平成 9 年 11 月 5 日

寄託機関に寄託について付した受託番号

FERM BP-6266

1 0 7

Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln
110 115 120
Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly
125 130 135
Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp
140 145 150
Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala
155 160 165
His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys
170 175 180
Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile
185 190 195
Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp
200 205 210
Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu
215 220 225
Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
230 235 240
Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
245 250 255
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His
260 265 270
Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly
275 280 285

1 0 8

Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro

290 295 300

Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile

305 310 315

Asp

316

配列番号：2

配列の長さ：1538

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

GGCAGGACCT CTGTGAACCG GTGGGGCGG GGGCCGCCTG GCCGGGAGTC TGCTCGGCCG 60
TGGGTGGCCG AGGAAGGGAG AGAACGATCG CGGAGCAGGG CGCCCGAACT CCGGGCGCCG 120
CGCCATGCGC CGGGCCAGCC GAGACTACGG CAAGTACCTG CGCAGCTCGG AGGAGATGGG 180
CAGCGGCCCC GGCGTCCCAC ACGAGGGTCC GCTGCACCCC GCGCCTTCTG CACCGGCTCC 240
GGCGCCGCCA CCCGCCGCCT CCCGCTCCAT GTTCCTGGCC CTCCTGGGGC TGGGACTGGG 300
CCAGGTGGTC TGCAGCATCG CTCTGTTCT GTACTTTCGA GCGCAGATGG ATCCTAACAG 360
AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCTTTA TAGAATCCTG AGACTCCATG AAAACGCAGG 420
TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT GACTCCTGCA GGAGGATGAA 480
ACAAGCCTT CAGGGGGCCG TGCAGAAGGA ACTGCAACAC ATTGTGGGGC CACAGCGCTT 540
CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGGAAAGGCTC ATGGTTGGAT GTGGCCCAGC GAGGCAAGCC 600

1 0 9

TGAGGCCAG CCATTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC AGCATCCAT CGGGTTCCA	660
TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG GCCAAGATCT CTAACATGAC	720
GTTAACAC GGAAAACCAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC TATTACCTGT ACGCCAACAT	780
TTGCTTCGG CATCATGAAA CATCGGAAAG CGTACCTACA GACTATCTTC AGCTGATGGT	840
GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT AACCTGATGA AAGGAGGGAG	900
CACGAAAAAC TGGTCGGCA ATTCTGAATT CCACTTTAT TCCATAAATG TTGGGGGATT	960
TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTCAAGGTG TCCAACCCTT CCCTGCTGGA	1020
TCCGGATCAA GATGCGACGT ACTTTGGGC TTTCAAAGTT CAGGACATAG ACTGAGACTC	1080
ATTCGTGGA ACATTAGCAT GGATGTCCTA GATGTTGGA AACTCTTAA AAAATGGATG	1140
ATGTCTATAC ATGTGTAAGA CTACTAAGAG ACATGGCCA CGGTGTATGA AACTCACAGC	1200
CCTCTCTCTT GAGCCTGTAC AGGTTGTGTA TATGTAAGT CCATAGGTGA TGTTAGATT	1260
ATGGTGATTA CACAACGGTT TTACAATTG GTAATGATT CCTAGAATTG AACCAGATTG	1320
GGAGAGGTAT TCCGATGCTT ATGAAAAACT TACACGTGAG CTATGGAAGG GGGTCACAGT	1380
CTCTGGGTCT AACCCCTGGA CATGTGCCAC TGAGAACCTT GAAATTAAGA GGATGCCATG	1440
TCATTGCAA GAAATGATAG TGTGAAGGGT TAAGTTCTTT TGAATTGTTA CATTGCGCTG	1500
GGACCTGCAA ATAAGTTCTT TTTTCTAAT GAGGAGAG	1538

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

1 1 0

AAACGCAAAA AACCAGAAAG G 21

配列番号： 4

配列の長さ： 17

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

配列番号： 5

配列の長さ： 17

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CAGGAAACAG CTATGAC 17

配列番号： 6

配列の長さ： 22

配列の型：核酸

鎖の数： 1

1 1 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AAGCCCCAAA GTACGTCGCA TC 22

配列番号：7

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGAAGCTTTC GAGCGCAGAT GGATCC 26

配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCTCTAGAGT CTATGTCCTG AAGTTG 27

配列番号：9

1 1 2

配列の長さ： 20

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATCAGAAGAC AGCACTCACT 20

配列番号： 10

配列の長さ： 33

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGGGTCGACC TAGGACATCC ATGCTAATGT TCC 33

配列番号： 11

配列の長さ： 317

配列の型：アミノ酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

1 1 3

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
5 10 15

Glu Met Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
35 40 45

Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
50 55 60

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser
65 70 75 80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
85 90 95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
100 105 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
115 120 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
130 135 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
145 150 155 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
165 170 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
180 185 190

1 1 4

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
195 200 205
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
210 215 220
His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val
225 230 235 240
Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met
245 250 255
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
260 265 270
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu
275 280 285
Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
290 295 300
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
305 310 315

配列番号：1 2

配列の長さ：9 5 4

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATGCGCCGGCG CCAGCAGAGA CTACACCAAG TACCTGCGTG GCTCGGAGGA GATGGGCGGC	60
GGCCCCGGAG CCCCGCACGA GGGCCCCCTG CACGCCCGC CGCCGCCCTGC GCCGCACCAG	120
CCCCCTGCCG CCTCCCGCTC CATGTTCGTG GCCCTCCTGG GGCTGGGCT GGGCCAGGTT	180
GTCTGCAGCG TCGCCCTGTT CTTCTATTTC AGAGCGCAGA TGGATCCTAA TAGAATATCA	240
GAAGATGGCA CTCACTGCAT TTATAGAATT TTGAGACTCC ATGAAAATGC AGATTTCAA	300
GACACAACTC TGGAGAGTCA AGATAACAAA TTAATACCTG ATTCACTGTAG GAGAATTAAA	360
CAGGCCTTTC AAGGAGCTGT GCAAAAGGAA TTACAACATA TCGTTGGATC ACAGCACATC	420
AGAGCAGAGA AAGCGATGGT GGATGGCTCA TGGTTAGATC TGGCCAAGAG GAGCAAGCTT	480
GAAGCTCAGC CTTTGCTCA TCTCACTATT AATGCCACCG ACATCCCATC TGGTTCCCAT	540
AAAGTGAGTC TGTCCTCTTG GTACCATGAT CGGGGTTGGG CCAAGATCTC CAACATGACT	600
TTTAGCAATG GAAAACATAAT AGTTAACATAG GATGGCTTTT ATTACCTGTA TGCCAACATT	660
TGCTTCGAC ATCATGAAAC TTCAGGAGAC CTAGCTACAG AGTATCTTCA ACTAATGGTG	720
TACGTCACTA AAACCAGCAT CAAAATCCA AGTTCTCATA CCCTGATGAA AGGAGGAAGC	780
ACCAAGTATT GGTCAGGGAA TTCTGAATTC CATTCTTATT CCATAAACGT TGGTGGATT	840
TTTAAGTTAC GGTCTGGAGA GGAAATCAGC ATCGAGGTCT CCAACCCCTC CTTACTGGAT	900
CCGGATCAGG ATGCAACATA CTTTGGGCT TTTAAAGTTC GAGATATAGA TTGA	954

配列番号：1 3

配列の長さ：2 7

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

1 1 6

GGCGTACGCA GAGCGCAGAT GGATCCT 27

配列番号：1 4

配列の長さ：3 4

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGGGTCGACC ATCCAGGAAA TATCATAACA CTCC 34

配列番号：1 5

配列の長さ：9 5 1

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATGCGCCGGG CCAGCCGAGA CTACGGCAAG TACCTGCGCA GCTCGGAGGA GATGGGCAGC 60

GGCCCCGGCG TCCCACACGA GGGTCCGCTG CACCCCGCGC CTTCTGCACC GGCTCCGGCG 120

CCGCCACCCG CGGCCTCCCG CTCCATGTTC CTGGCCCTCC TGGGGCTGGG ACTGGGCCAG 180

GTGGTCTGCA GCATCGCTCT GTTCCTGTAC TTTCGAGCGC AGATGGATCC TAACAGAATA 240

TCAGAAAGACA GCACTCACTG CTTTTATAGA ATCCTGAGAC TCCATGAAAA CGCAGGTTG 300

CAGGACTCGA CTCTGGAGAG TGAAGACACA CTACCTGACT CCTGCAGGAG GATGAAACAA 360

GCCTTCAGG GGGCGTGCA GAAGGAAGTG CAACACATTG TGGGGCCACA GCGCTTCTCA 420

1 1 7

GGAGCTCCAG CTATGATGGA AGGCTCATGG TTGGATGTGG CCCAGCGAGG CAAGCCTGAG 480
 GCCCAGCCAT TTGCACACCT CACCATCAAT GCTGCCAGCA TCCCATCGGG TTCCCATAAA 540
 GTCACTCTGT CCTCTTGGTA CCACGATCGA GGCTGGGCCA AGATCTCTAA CATGACGTTA 600
 AGCAACGGAA AACTAAGGGT TAACCAAGAT GGCTTCTATT ACCTGTACGC CAACATTGC 660
 TTTCGGCATC ATGAAACATC GGGAAAGCGTA CCTACAGACT ATCTCAGCT GATGGTGTAT 720
 GTCGTTAAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT TCTCATAACC TGATGAAAGG AGGGAGCACG 780
 AAAAACTGGT CGGGCAATTG TGAATTCCAC TTTTATTCCA TAAATGTTGG GGGATTTTC 840
 AAGCTCCGAG CTGGTGAAGA ATTAGCATT CAGGTGTCCA ACCCTTCCCT GCTGGATCCG 900
 GATCAAGATG CGACGTACTT TGGGGCTTTC AAAGTTCAAGG ACATAGACTG A 951

配列番号：1 6

配列の長さ：244

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe

1 5 10 15

Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr

20 25 30

Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln

35 40 45

1 1 8

Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro
50 55 60
Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp
65 70 75 80
Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr
85 90 95
Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser
100 105 110
Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu
115 120 125
Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr
130 135 140
Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr
145 150 155 160
Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile
165 170 175
Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser
180 185 190
Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe
195 200 205
Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser
210 215 220
Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val
225 230 235 240

1 1 9

Gln Asp Ile Asp

配列番号：17

配列の長さ：246

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile

1 5 10 15

Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr

20 25 30

Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile

35 40 45

Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val

50 55 60

Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp

65 70 75 80

Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His

85 90 95

Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser

100 105 110

Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met

1 2 0

115	120	125	
Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr			
130	135	140	
Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu			
145	150	155	160
Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile			
165	170	175	
Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr			
180	185	190	
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly			
195	200	205	
Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn			
210	215	220	
Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe			
225	230	235	240
Lys Val Arg Asp Ile Asp			
245			

配列番号：1 8

配列の長さ：7 3 5

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

1 2 1

配列：

GCCGAGATGG ATCCTAACAG AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCCTTTA TAGAATCCTG	60
AGACTCCATG AAAACGCAGG TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT	120
GAECTCCTGCA GGAGGGATGAA ACAAGCCTTT CAGGGGGCCG TGCAAGAGA ACTGCAACAC	180
ATTGTGGGGC CACAGCGCTT CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGGAAGGCTC ATGGTTGGAT	240
GTGGCCCAGC GAGGCAAGCC TGAGGCCAG CCATTTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC	300
AGCATCCCAC CGGGTTCCCA TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG	360
GCCAAGATCT CTAACATGAC GTTAAGCAAC GGAAAATAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC	420
TATTACCTGT ACGCCAACAT TTGCTTCGG CATCATGAAA CATCGGAAG CGTACCTACA	480
GAECTATCTTC AGCTGATGGT GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT	540
AACCTGATGA AAGGAGGGAG CACGAAAAAC TGGTCGGGCA ATTCTGAATT CCACCTTTAT	600
TCCATAAAATG TTGGGGGATT TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTCAAGGTG	660
TCCAACCCTT CCCTGCTGGA TCCGGATCAA GATGCCACGT ACTTTGGGGC TTTCAAAGTT	720
CAGGACATAG ACTGA	735

配列番号：19

配列の長さ：741

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

GCCGAGATGG ATCCTAACAG AATATCAGAA GATGGCACTC ACTGCATTAA TAGAATTGG	60
AGACTCCATG AAAATGCAGA TTTTCAAGAC ACAACTCTGG AGAGTCAAGA TACAAAATTA	120

1 2 2

ATACCTGATT CATGTAGGAG AATTAAACAG GCCTTCAAG GAGCTGTGCA AAAGGAATTA 180
CAACATATCG TTGGATCACA GCACATCAGA GCAGAGAAAG CGATGGTGGA TGGCTCATGG 240
TTAGATCTGG CCAAGAGGAG CAAGCTGAA GCTCAGCCTT TTGCTCATCT CACTATTAAT 300
GCCACCGACA TCCCATCTGG TTCCCATAAA GTGAGTCTGT CCTCTTGGTA CCATGATCGG 360
GGTTGGGCCA AGATCTCCAA CATGACTTTT AGCAATGGAA AACTAATAGT TAATCAGGAT 420
GGCTTTATT ACCTGTATGC CAACATTGC TTTGACATC ATGAAACTTC AGGAGACCTA 480
GCTACAGAGT ATCTTCAACT AATGGTGTAC GTCACTAAAA CCAGCATCAA AATCCAAGT 540
TCTCATACCC TGATGAAAGG AGGAAGCACC AAGTATTGGT CAGGGAAATTC TGAATTCCAT 600
TTTTATTCCA TAAACGTTGG TGGATTTTT AAGTTACGGT CTGGAGAGGA AATCAGCATC 660
GAGGTCTCCA ACCCCTCCTT ACTGGATCCG GATCAGGATG CAACATACTT TGGGGCTTT 720
AAAGTTCGAG ATATAGATTG A 741

請求の範囲

1. 次の物理化学的性質及び生物活性を有する新規蛋白質。
 - a. 親和性：破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor ; OCIF) に特異的に結合し、高い親和性（細胞膜上での解離定数、Kd値が 10^{-9} M以下）を有する。
 - b. 分子量：非還元条件下におけるSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分子量測定で、約30,000-40,000 又は約40,000±4,000 の分子量を示し、モノマータイプのOCIFとクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は、約90,000-110,000を示す。
 - c. 生物活性：活性型ビタミンD₃及び副甲状腺ホルモン(PTH)などの、骨吸収促進因子存在下でのマウス骨芽細胞様ストローマ細胞とマウス脾臓細胞共培養において、破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する活性を有する。
2. 骨吸収促進因子存在下で培養した骨芽様細胞株あるいは骨髄由来のストローマ細胞から細胞の膜画分を調製し、界面活性剤で膜蛋白質を可溶化し、OCIF固定化アフィニティカラムを用いて精製することを特徴とする、請求の範囲1記載の蛋白質の製造方法。
3. 請求の範囲1記載の蛋白質を用い、この蛋白質に特異的に結合し、その蛋白質の生物活性を阻害あるいは修飾する物質をスクリーニングする方法。
4. 請求の範囲1記載の蛋白質を用い、この蛋白質に特異的に結合し、その蛋白質の生物活性を伝達する物質をスクリーニングする方法。
5. 請求の範囲3又は4記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。
6. 請求の範囲1記載の蛋白質に対する抗体。

7. 請求の範囲 6 記載の抗体を有効成分とする骨代謝異常症治療剤。
8. 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列をコードするDNA。
9. 配列表配列番号 2 記載の塩基配列からなる DNA。
10. 配列表配列番号 2 記載の塩基配列の 1 又はそれ以上の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入されており、且つ破骨細胞抑制因子に特異的に結合し、その活性を抑制する性質を有する蛋白質をコードするDNA。
11. 請求の範囲 8 又は10のいずれかに記載のDNAと比較的温和な条件下でハイブリダイズするDNA。
12. 請求の範囲 8 ~11のいずれかに記載の DNAと70%以上の相同性を有する DNA。
13. 請求の範囲 8 ~12のいずれかに記載の DNAを遺伝子工学的に発現することにより得られる蛋白質。
14. 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する請求の範囲13記載の蛋白質。
15. 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。
16. 請求の範囲 8 ~12記載の DNAを用いて遺伝子工学的に產生させることを特徴とする蛋白質の製造法。
17. 請求の範囲 8 ~12のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法。
18. 請求の範囲 8 ~12のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その生物活性を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法。
19. 請求の範囲 8 ~12のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その結合を通して該蛋白質の生物活性を伝達する物質のスクリーニング方法。
20. 請求の範囲17~19のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物

質を含有する医薬組成物。

21. 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列の76~316 番目のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードする DNA。
22. 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列の72~316 番目のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードする DNA。
23. 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードするDNA。
24. 破骨細胞形成抑制因子OCIFに特異的に結合し、その生物活性を抑制する作用を有する蛋白質をコードする、請求の範囲21~23のいずれかに記載の DNA。
25. 配列表配列番号 2 の塩基配列を有する、請求の範囲21~24のいずれかに記載のDNA。
26. 請求の範囲21~25のいずれかに記載の DNAと比較的温和な条件下でハイブリダイズするDNA。
27. 請求の範囲21~26のいずれかに記載の DNAと70%以上の相同性を有する DNA。
28. 請求の範囲21~27のいずれかに記載の DNAを遺伝子工学的に発現することにより得られるポリペプチドを含む蛋白質。
29. 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有することを特徴とする、請求の範囲28記載の蛋白質。
30. 配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体である、請求の範囲28又は29に記載の蛋白質。
31. 請求の範囲21~27のいずれかに記載の DNAを用いて遺伝子工学的に生産させることを特徴とする蛋白質の製造方法。
32. 請求の範囲21~27のいずれかに記載のDNAによりコードされる蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法。

33. 請求の範囲21～27のいずれかに記載のDNAによりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その生物活性を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法。
34. 請求の範囲21～27のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その結合を通して該蛋白質の生物活性を伝達する物質のスクリーニング方法。
35. 請求の範囲32～34のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。
36. 配列表配列番号11記載のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードするDNA。
37. 破骨細胞形成抑制因子OCIFに特異的に結合し、その活性を抑制する活性を有する蛋白質をコードする、請求の範囲36に記載の DNA。
38. 配列表配列番号12記載の塩基配列を有する、請求の範囲36又は37記載のDNA。
39. 請求の範囲36～38のいずれかに記載のDNAと比較的温和な条件下でハイブリダイズするDNA。
40. 請求の範囲36～39のいずれかに記載の DNAと70%以上の相同性を有する DNA。
41. 請求の範囲36～40のいずれかに記載の DNAを遺伝子工学的に発現することにより得られるポリペプチドを含む蛋白質。
42. 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する請求の範囲41記載の蛋白質。
43. 配列表配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体である、請求の範囲41又は42に記載の蛋白質。
44. 請求の範囲36～40のいずれかに記載の DNAを用いて遺伝子工学的に生産させることを特徴とする蛋白質の製造方法。
45. 請求の範囲36～40のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質の発現

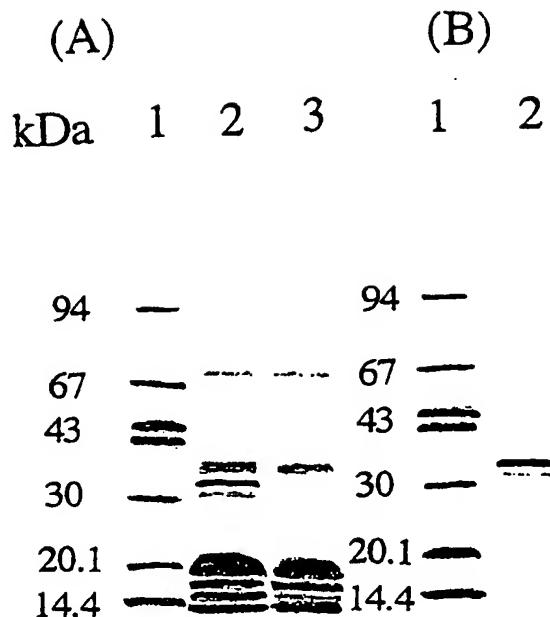
を調節する物質のスクリーニング方法。

46. 請求の範囲36～40のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その生物活性を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法。
47. 請求の範囲36～40のいずれかに記載の DNAによりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その結合を通して該蛋白質の生物活性を伝達する物質のスクリーニング方法。
48. 請求の範囲45～47のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。
49. 破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) に特異的に結合する膜結合蛋白質分子 (OBM) 及び／又はその膜結合部位を欠損した可溶性OBM(sOBM) を認識する抗体。
50. マウスOBM 及び／又はマウスsOBMを認識することを特徴とする、請求の範囲49記載の抗体。
51. ヒトOBM 及び／又はヒトsOBMを認識することを特徴とする、請求の範囲49記載の抗体。
52. ポリクローナル抗体である、請求の範囲49記載の抗体。
53. モノクローナル抗体である、請求の範囲49記載の抗体。
54. ヒトOBM 及び／又はヒトsOBM及び／又はマウスOBM 及び／又はマウスsOBMに交差性を有する請求の範囲53のモノクローナル抗体。
55. 次の性質を有する、請求の範囲53記載のモノクローナル抗体。
 - a) 分子量：約150,000
 - b) サブクラス：IgG₁又はIgG₂
 - c) ライトチェイン： κ 鎖
56. マウス又はヒトのOBM 又はsOBMで動物を免疫し、その動物の血液を精製することを特徴とする、ポリクローナル抗体の製造方法。

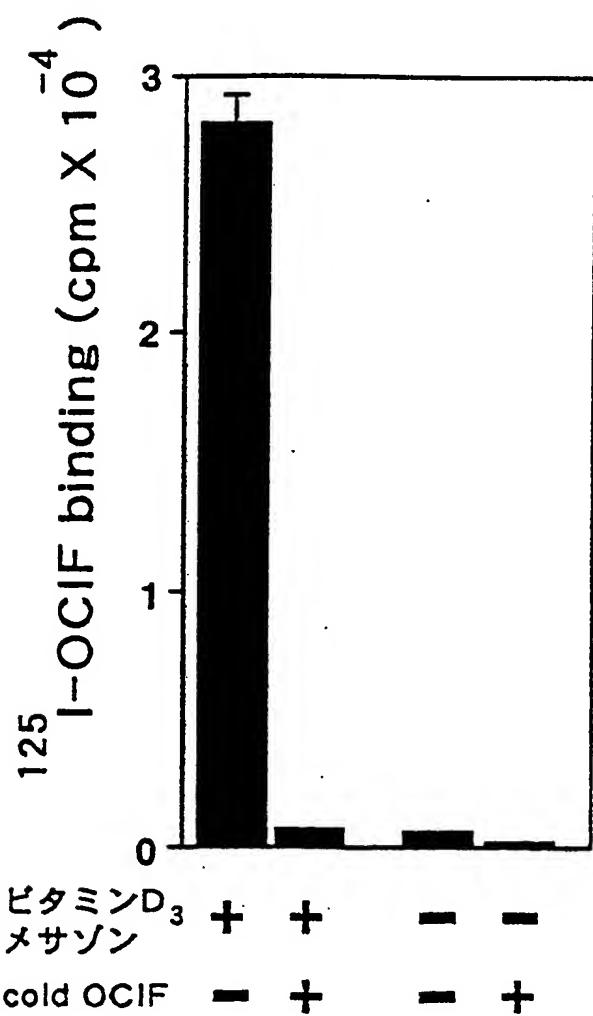
57. 請求の範囲54又は53～55記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。
58. 受託番号 FERM BP-6264, FERM BP-6265 又はFERM BP-6266である、ハイブリドーマ。
59. 請求の範囲57又は58記載のハイブリドーマを培養し、培養液中にモノクローナル抗体を產生させ、これをその培養液から精製、回収することを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法。
60. 請求の範囲49～55のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、OBM の測定方法。
61. 請求の範囲49～55のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、sOBM の測定方法。
62. 請求の範囲49～55のいずれかに記載の抗体を固相抗体及び酵素標識抗体として用いることを特徴とする、OBM又はsOBMの測定方法。
63. 請求の範囲49～55のいずれかに記載の抗体を有効成分とする医薬。
64. 請求の範囲49～57のいずれかに記載の抗体を有効成分とする、骨代謝異常症 予防及び／又は治療剤。

1 / 17

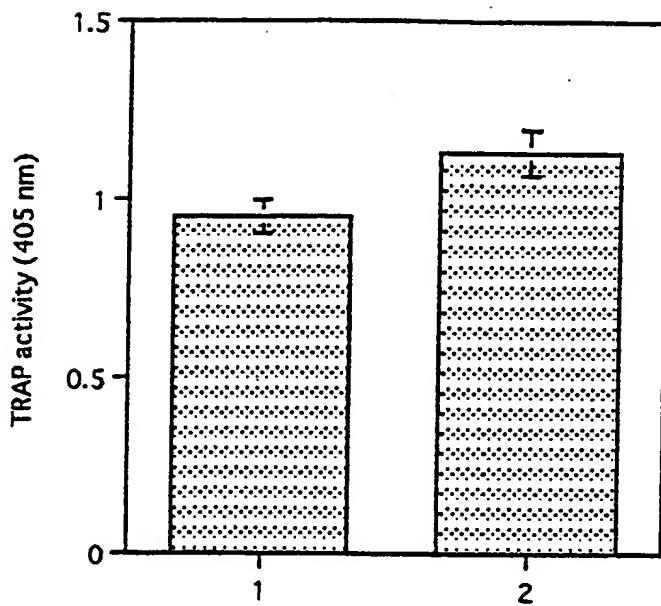
第1図



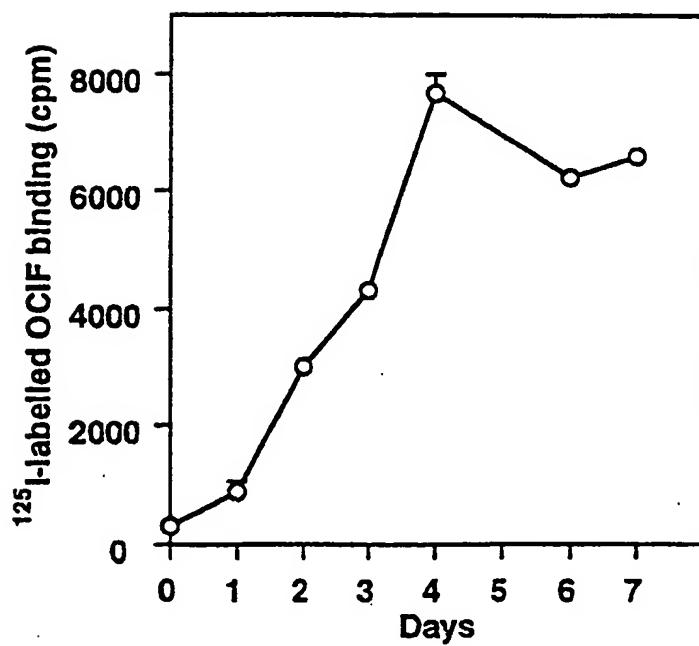
第2図



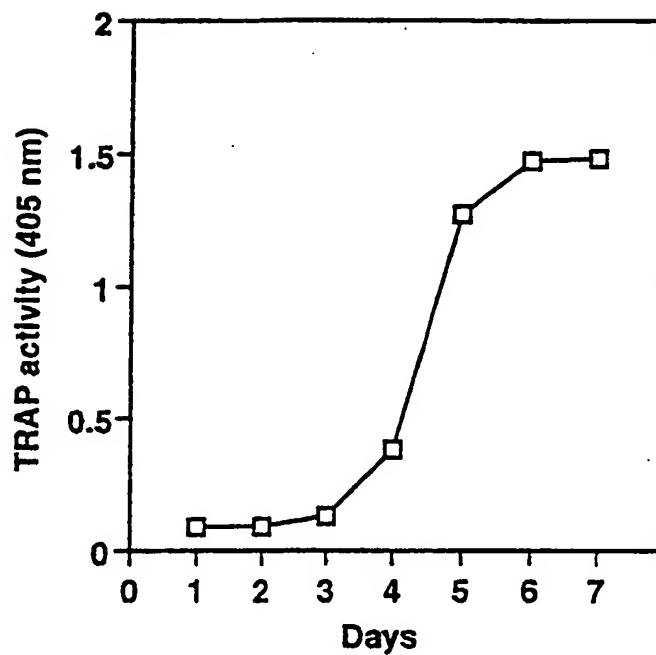
第3図



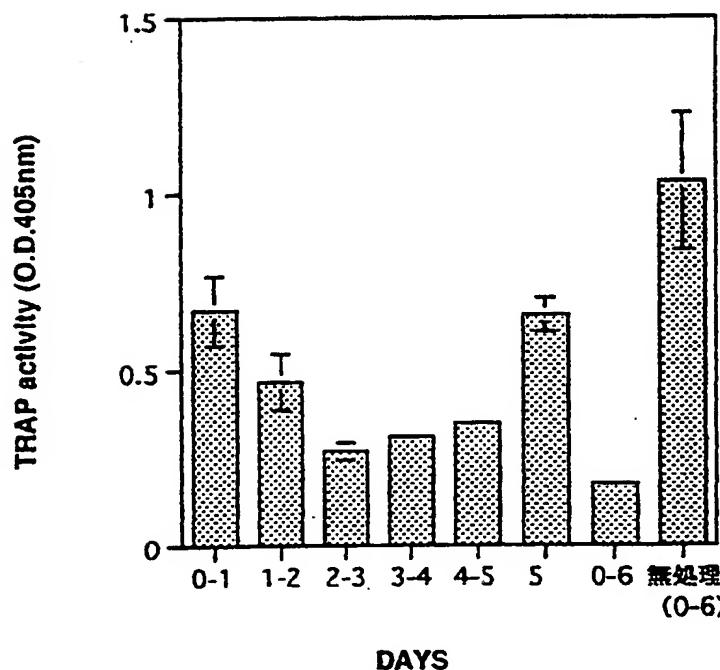
第4図



第5図

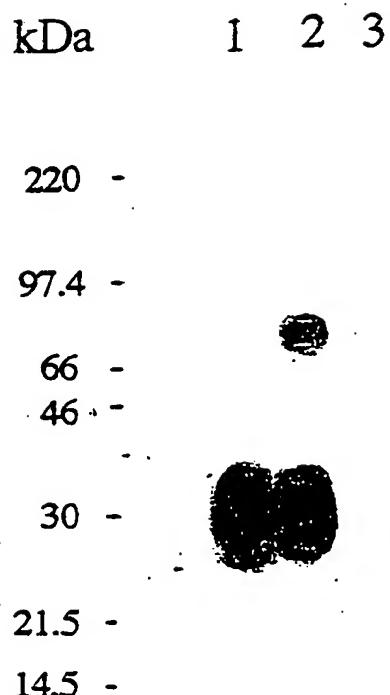


第6図

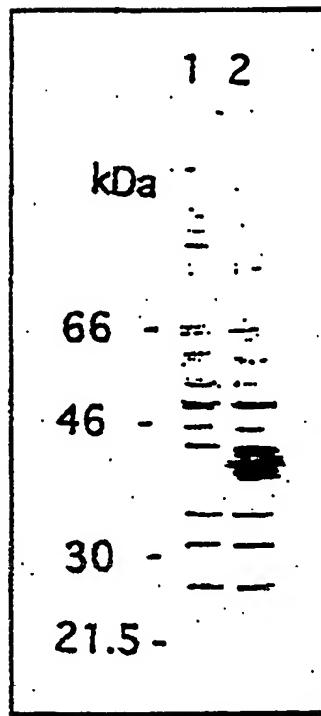


4 / 17

第7図

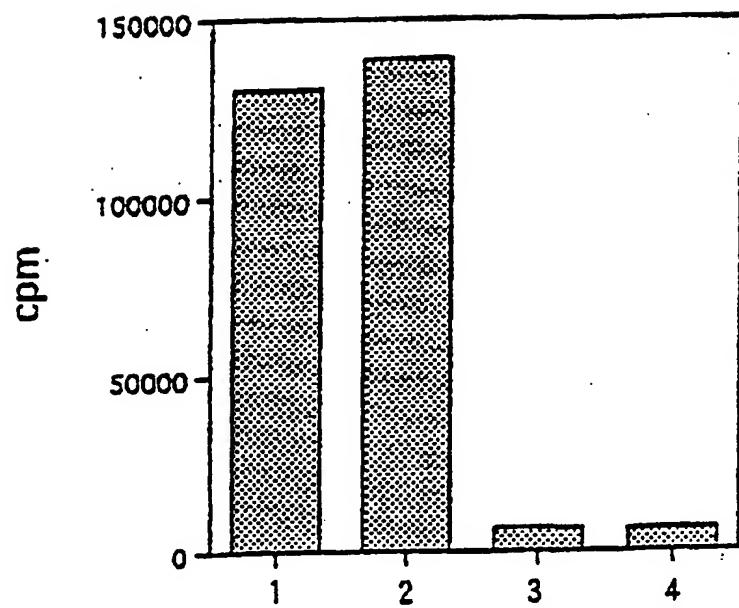


第8図

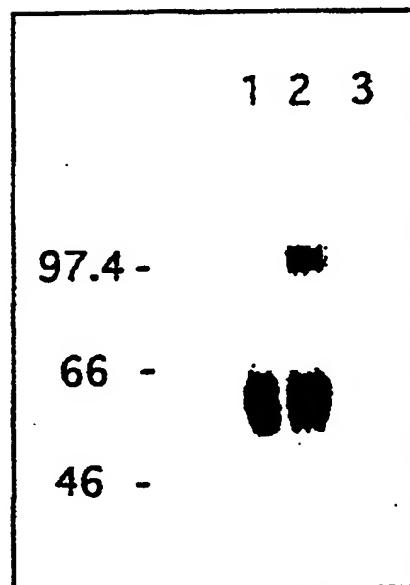


5 / 17

第9図



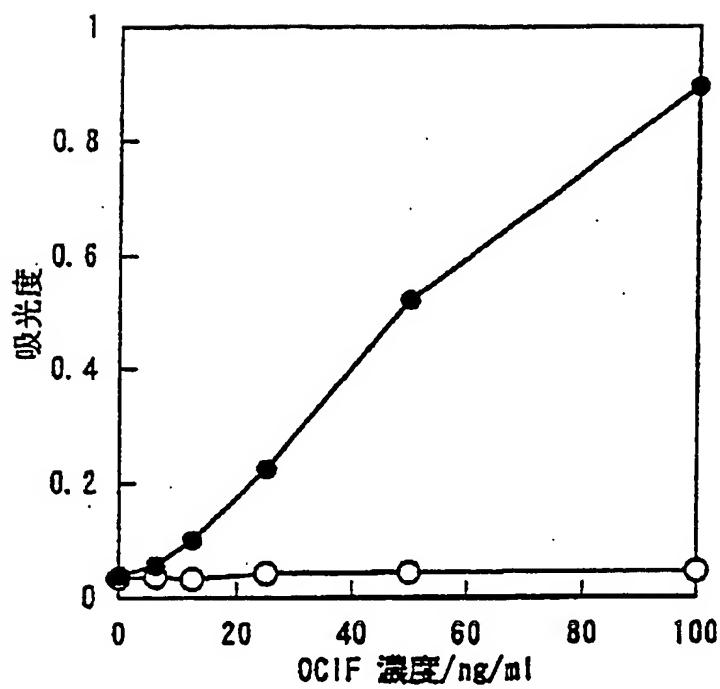
第10図



第11図

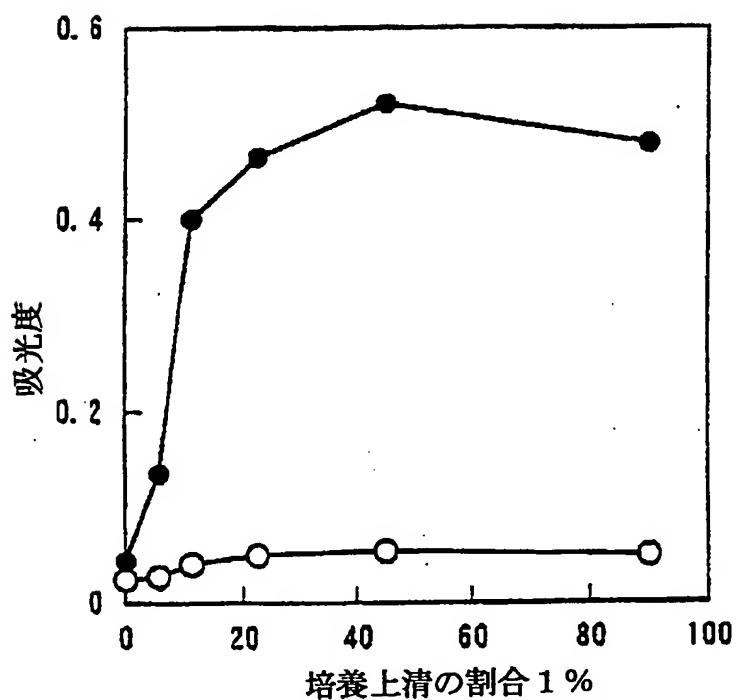


第12図

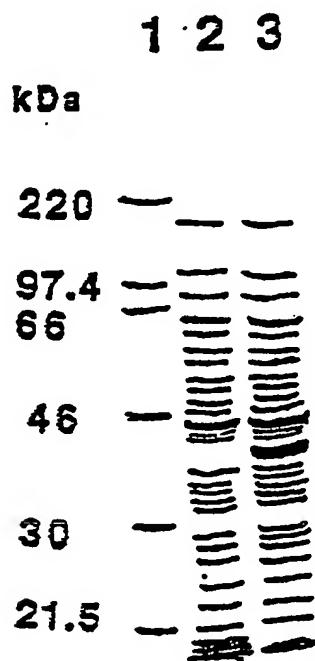


7 / 17

第13図

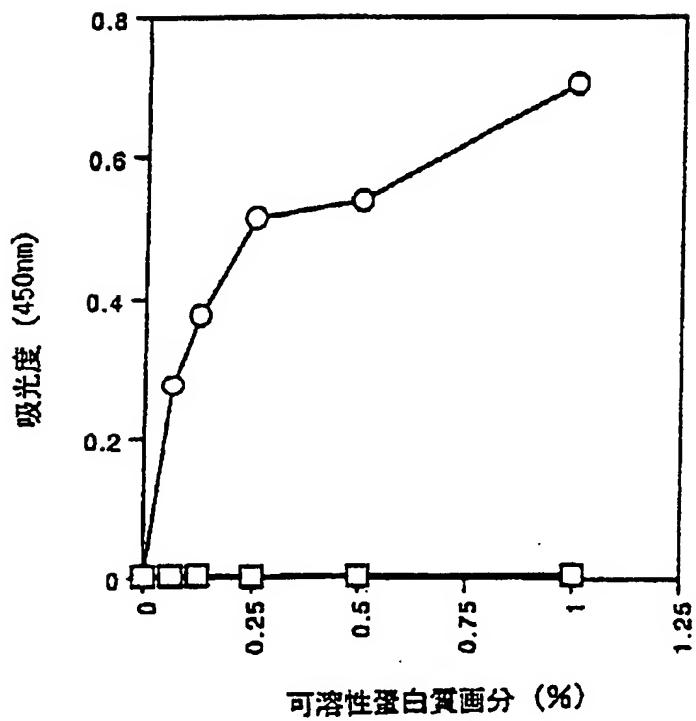


第14図

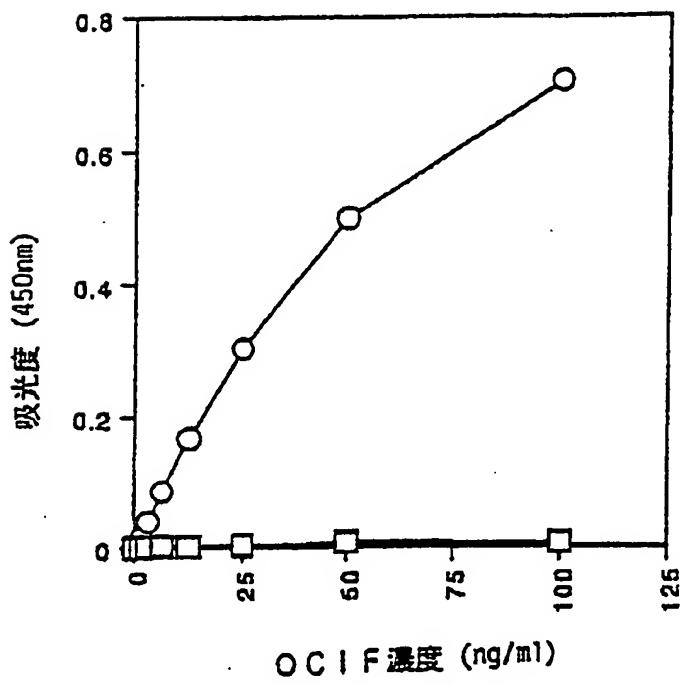


8 / 17

第15図

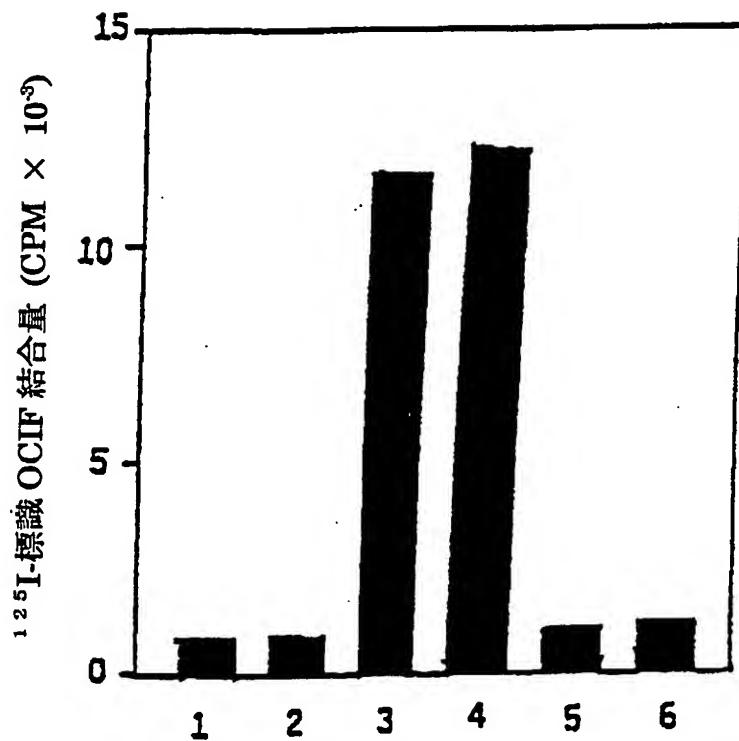


第16図

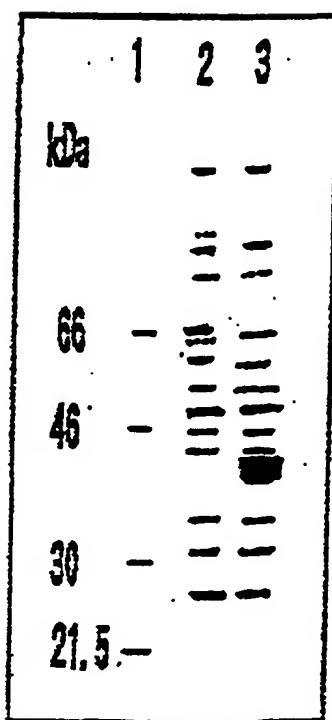


9 / 17

第17図

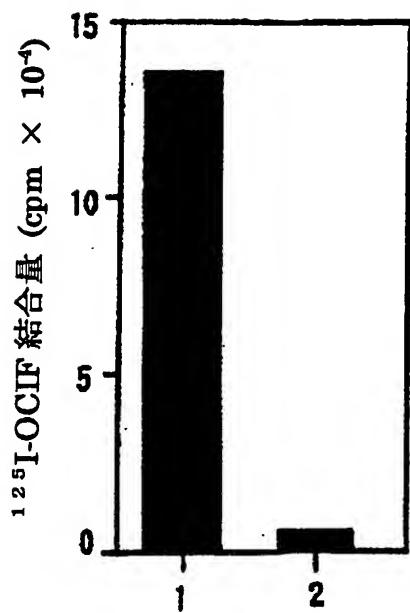


第18図

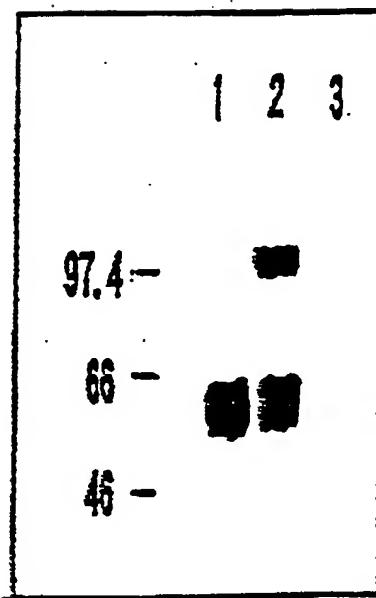


10 / 17

第19図

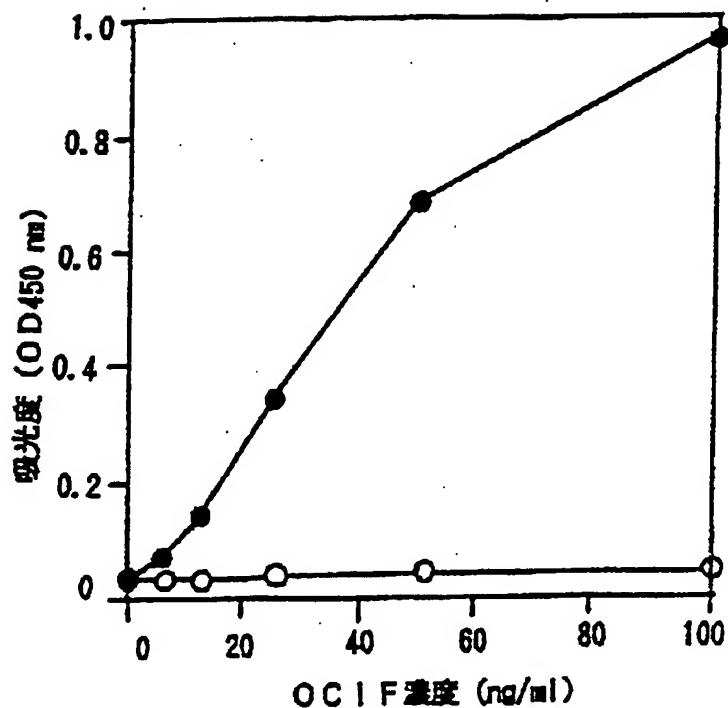


第20図

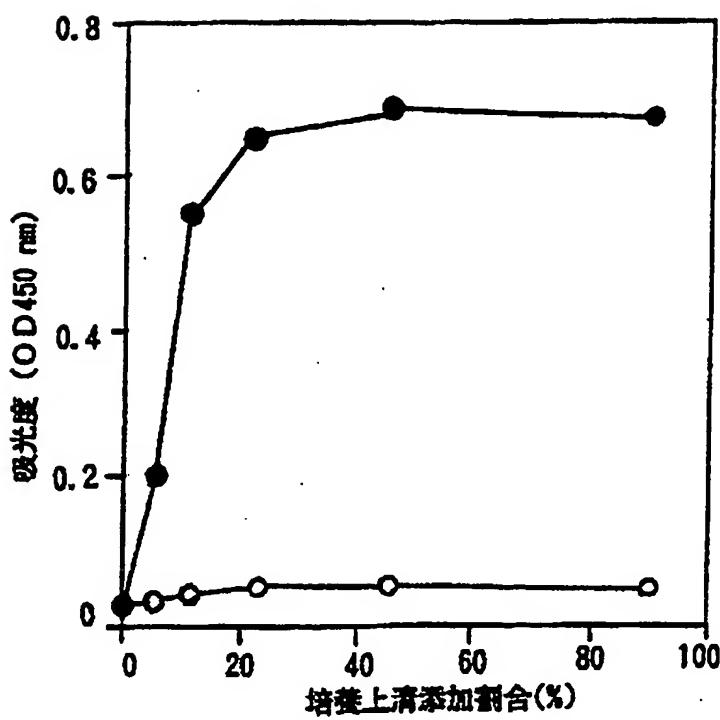


11 / 17

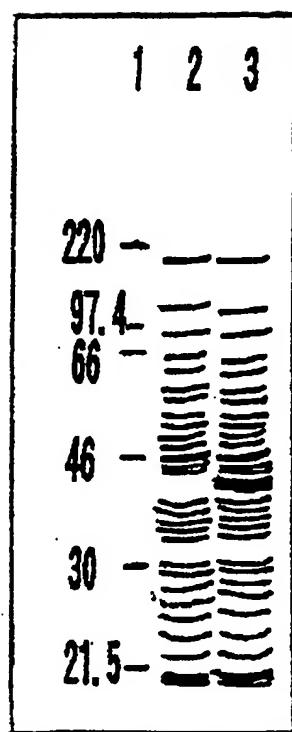
第21図



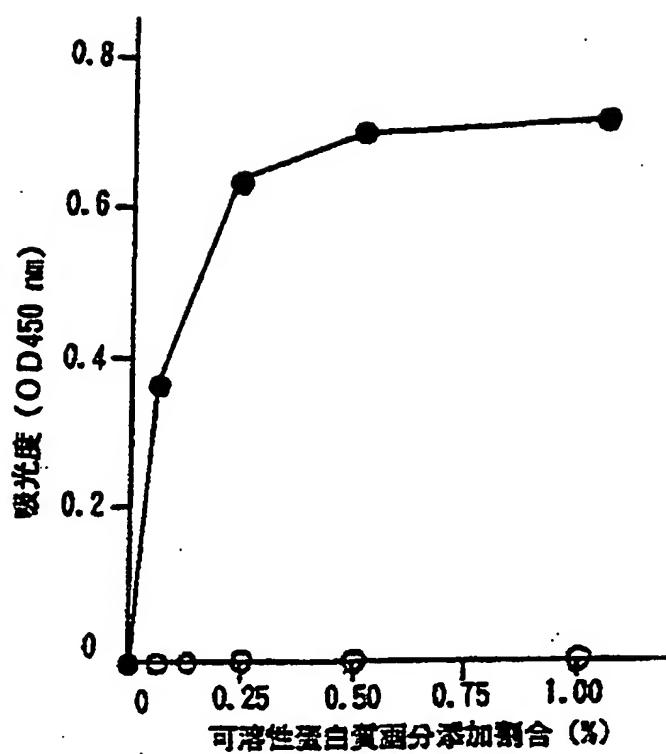
第22図



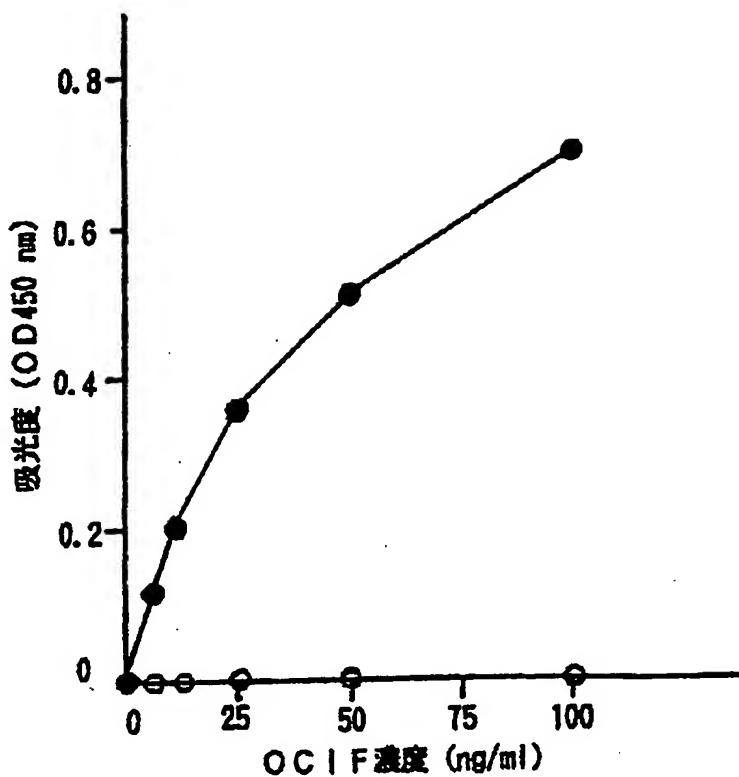
第23図



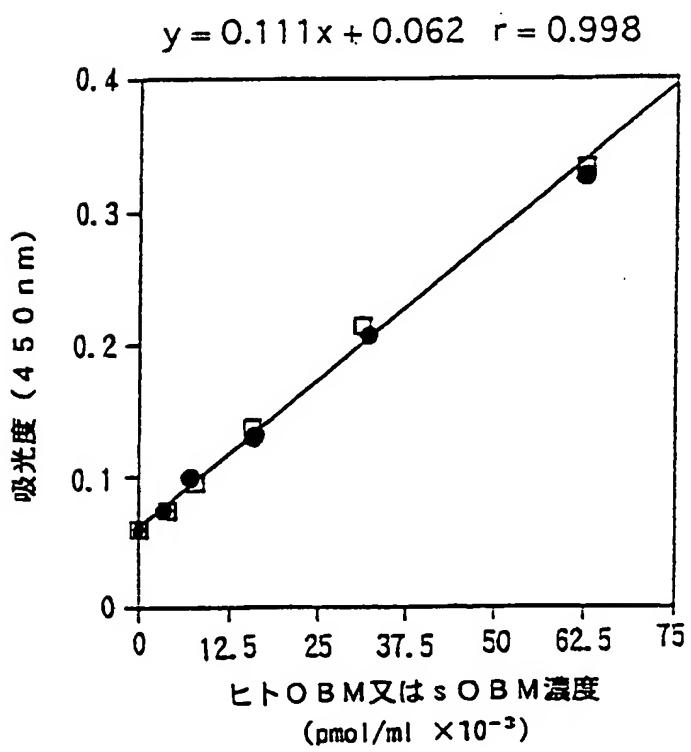
第24図



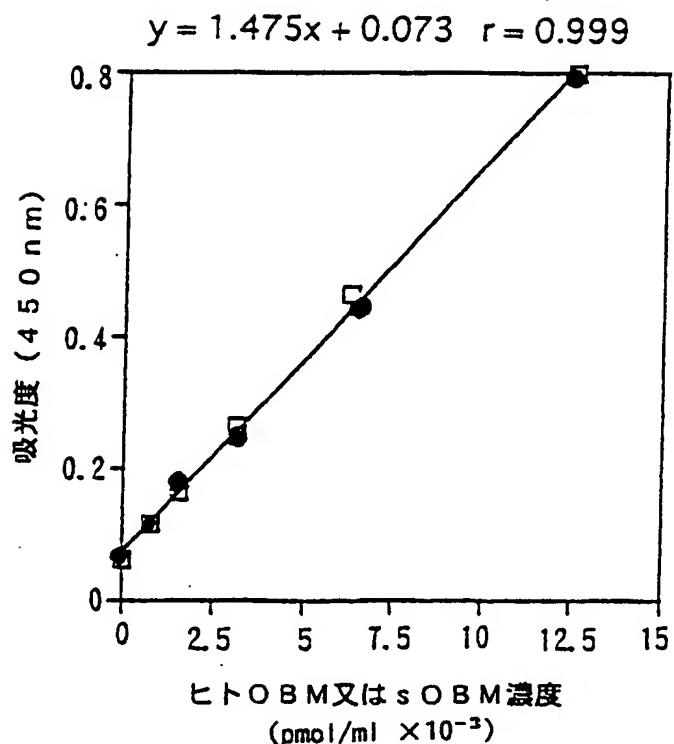
第25図



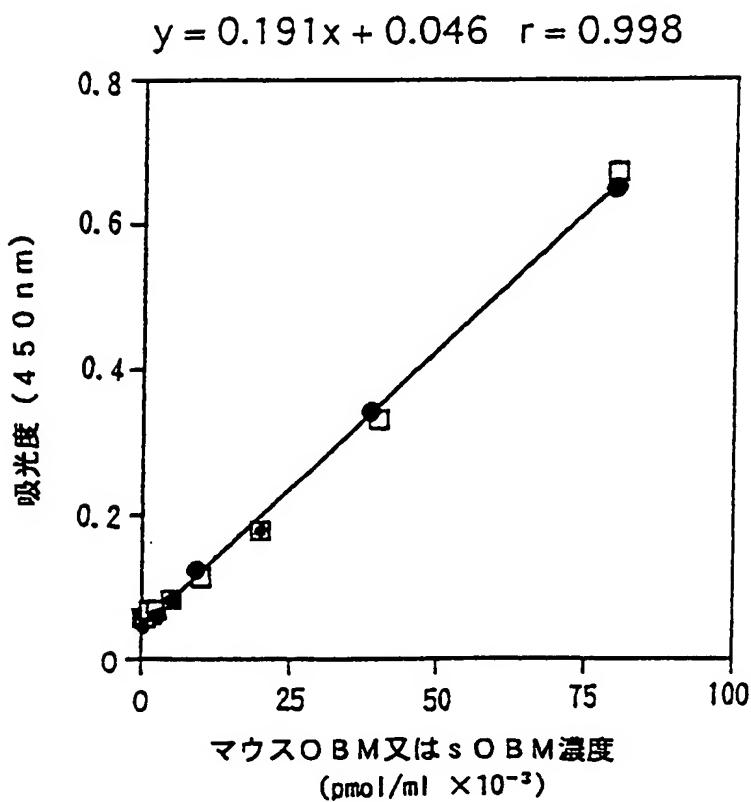
第26図



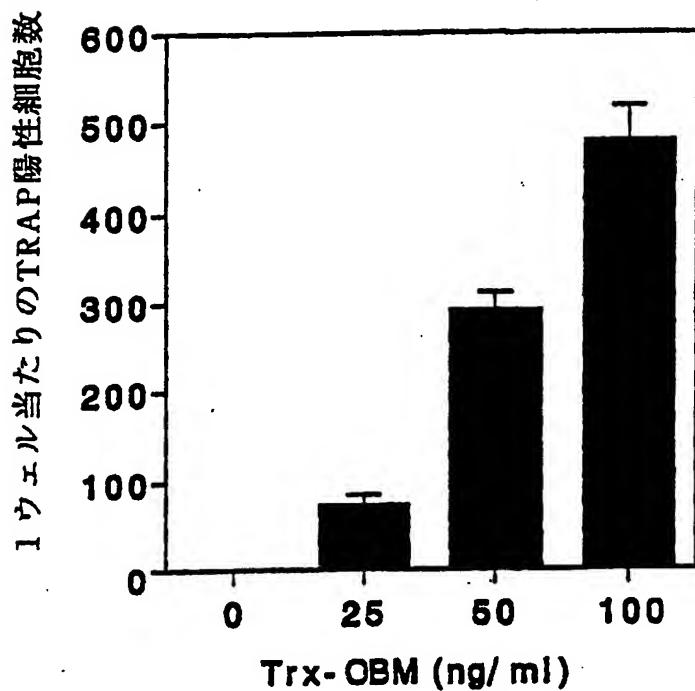
第27図



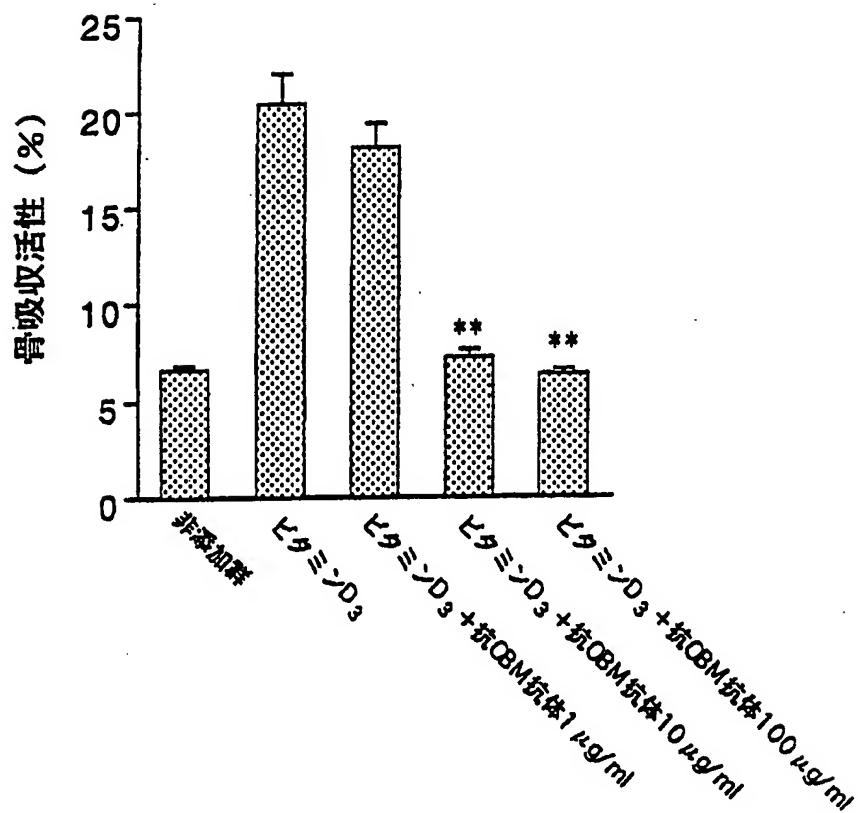
第28図



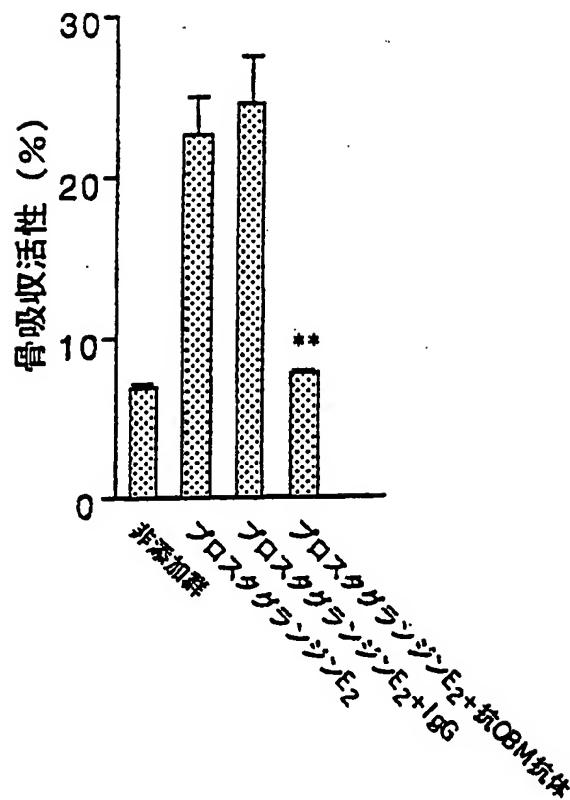
第29図



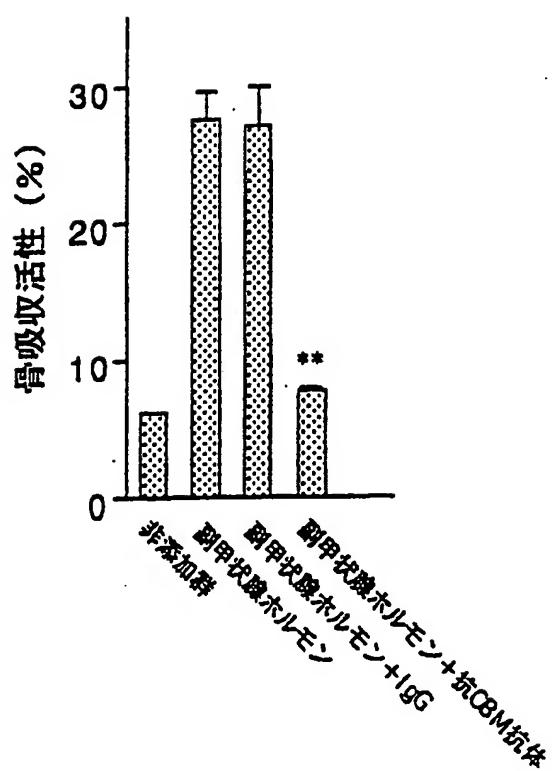
第30図



第31図

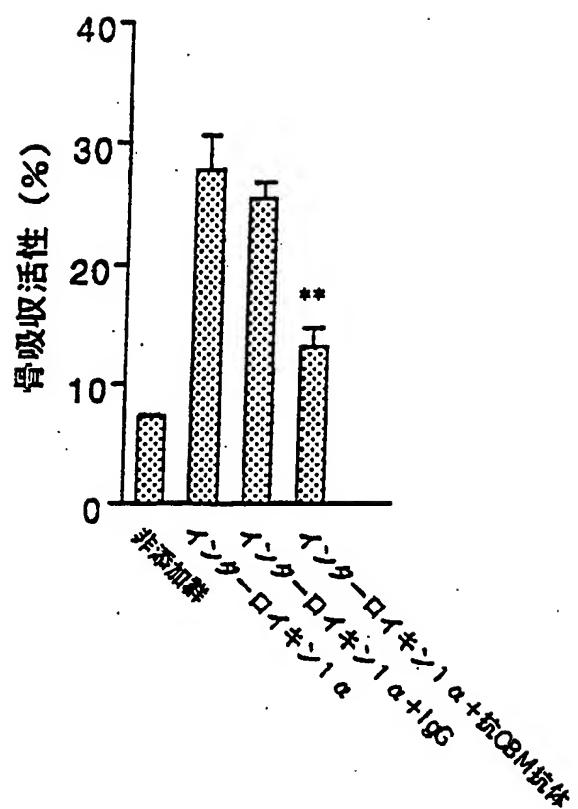


第32図



17 / 17

第33図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/715, C07K16/28, C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C12N5/20,
C12P21/08, G01N33/577, G01N33/53, A61K45/00, A61K39/395, A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/715, C07K16/28, C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C12N5/20,
C12P21/08, G01N33/577, G01N33/53, A61K45/00, A61K39/395, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ/EMBL/GenBank (GENETYX), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANDERSON, D.M., et al., "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function", Nature (November 13, 1997) Vol. 390, p.175-179	1-64
A	WONG, B.R., et al., "TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cell", J. Biol. Chem. (October 28, 1997) Vol. 272, No. 40, p.24727-25408	1-64
A	TSUDA, E., et al., "Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis", Biochem. Biophys. Res. Commun. (May 8, 1997) Vol. 234, No. 1, p.137-142	1-64
A	KAJI, H., et al., "Insulin-like growth factor-I mediates osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone", Journal of Cellular Physiology (July 10, 1997) Vol. 172, No. 1, p.55-62	1-64

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
July 10, 1998 (10. 07. 98)Date of mailing of the international search report
July 21, 1998 (21. 07. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01728

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/26217, A1 (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), August 29, 1996 (29. 08. 96) & AU, 9646773, A & ZA, 9601334, A & NO, 9703801, A & FI, 9703402, A & EP, 816380, A1	1-64

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C07K14/715, C07K16/28, C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C12N5/20, C12P21/08
G01N33/577, G01N33/53, A61K45/00, A61K39/395, A61K38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C07K14/715, C07K16/28, C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C12N5/20, C12P21/08
G01N33/577, G01N33/53, A61K45/00, A61K39/395, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ/EMBL/GenBank (GENETYX),
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ANDERSON, D. M., et al. "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function", Nature (13. 11月. 1997) 第390巻, p. 175-179	1-64
A	WONG, B. R., et al. "TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cell", J. Biol. Chem. (28. 10月. 1997) 第272巻, 第40号, p. 24727-25408	1-64

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 07. 98

国際調査報告の発送日

21.07.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C(続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	TSUDA, E., et al. "Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis", Biochem. Biophys. Res. Commun. (8.5月.1997) 第234巻, 第1号, p. 137-142	1-64
A	KAJI, H., et al. "Insulin-like growth factor-I mediates osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone", Journal of Cellular Physiology (10.7月.1997) 第172巻, 第1号, p. 55-62	1-64
A	WO, 96/26217, A1 (雪印乳業株式会社) 29. 8月. 1996 (29. 08. 96) &AU, 9646773, A &ZA, 9601334, A &NO, 9703801, A &FI, 9703402, A &EP, 816380, A1	1-64

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.